



CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO  
PARA UTILIZAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTAR

MARIA ISABEL DA SILVA SANTOS

ORIENTADOR(A): *Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira*

COORIENTADOR(A): *Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, Professora Associada com  
Agregação, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa*

*Doutora Laurentina Maria Rilhas Pedroso, Professora Catedrática Convidada da Faculdade de  
Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias*

TESE ELABORADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA  
ALIMENTAR

2016

CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO  
PARA UTILIZAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTAR

MARIA ISABEL DA SILVA SANTOS

*ORIENTADOR(A): Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira*

*COORDINADOR(A): Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, Professora Associada com  
Agregação, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa*

*Doutora Laurentina Maria Rilhas Pedroso, Professora Catedrática Convidada da Faculdade de  
Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias*

TESE ELABORADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA  
ALIMENTAR

**Presidente:** Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Catedrático, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

**Vogais:** Doutor Ricardo Manuel de Seixas Boavida Ferreira, Professor Catedrático, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa;

Doutora Maria Teresa Ferreira de Oliveira Barreto Goulão Crespo, Investigadora Principal, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica;

Doutora Maria Luísa Mourato de Oliveira Marques Serralheiro, Professora Auxiliar com agregação, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa;

Doutora Maria Leonor Faleiro, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve;

Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira, Professora Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa;

Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo, Professora Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

2016

Existem pessoas nas nossas vidas que nos fazem felizes pela simples casualidade de terem cruzado o  
nosso caminho....

*Aos meus filhos*

*Ao meu companheiro de sempre*

*A todas as folhas da minha árvore, às que caem, às que ficam e sobretudo às especiais....*

## **Agradecimentos**

Ao concluir esta Tese de Doutoramento não posso deixar de expressar o meu reconhecimento a todos os que me prestaram apoio e que de uma forma decisiva contribuíram para a sua concretização. Que todas, sem exceção, encontrem nestas palavras os meus mais profundos e respeitosos apreço e gratidão:

À Professora Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira, em 1º lugar por me ter lançado este desafio e ter aceitado ser a orientadora, mas também pela indicação do tema que permitiu dar continuidade ao trabalho desenvolvido no Mestrado. Por todo o apoio, incentivo, inteira disponibilidade e amizade, bem como pelo apoio dado na redação dos artigos e revisão crítica do trabalho escrito;

À Professora Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa pelos ensinamentos numa área completamente nova, pelas ideias lançadas em discussão, pela compreensão, incentivo e por ter aceitado ser coorientadora desta tese;

À Professora Doutora Laurentina Maria Rilhas Pedroso pela oportunidade, pela compreensão, pelo carinho e amizade, pela dispensa do serviço docente na fase crítica e por ter aceitado também ser coorientadora desta tese;

Ao Professor Doutor Ricardo Manuel de Seixas Boavida Ferreira, por me ter aceitado no grupo de trabalho, por toda a disponibilidade, interesse, indicação de novos caminhos;

À Doutora Ana Isabel Gusmão Lima pelo apoio e disponibilidade incondicionais a todos os níveis, pela força e incentivo transmitidos sempre, por ser quem é e estar sempre presente quando necessário. Por toda a generosidade, amizade e afeto com que sempre me presenteou;

Ao Professor Doutor Pedro Louro pelo tempo disponibilizado, e pelos conhecimentos partilhados;

À Eng<sup>a</sup> Ana Carla Silva por todo o apoio prestado e pela disponibilidade;

Aos alunos de Mestrado que contribuíram para a realização do trabalho de laboratório, Maria João Nunes, Cátia Veríssimo, Ana Cação, Sandro Martins, Catarina Almeida, Miguel Cortês Abreu e Sabrina Oliveira;

À Mestre Patrícia Fradinho pelo apoio com os ensaios físicos e tratamento de dados assim como pela paciência e total disponibilidade;

À Dra. Maria Antónia Calhau Coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) por ter viabilizado a execução dos ensaios de

microbiologia no INSA, pela estima e amizade com que sempre me trata e por me fazer sentir “em casa”;

À Dra. Rosália Furtado do Laboratório de Microbiologia do DAN, pelo apoio incondicional e disponibilidade de todos os meios necessários, mas também pela já longa amizade que sempre demonstra;

À Eng<sup>a</sup> Cristina Belo Correia pelo espírito de colaboração, pela amizade e partilha;

À Dra. Maria João Alves e Dra. Anabela Coelho pelo apoio prestado no laboratório;

A todas as colegas do laboratório de microbiologia por terem feito parte do painel de provadores e pela paciência e apoio sempre demonstrados;

À D. Lena pelo apoio com os meios de cultura e D. Manuela ambas do Laboratório de Microbiologia do ISA pelo apoio, disponibilidade e simpatia

À D. Helena do Laboratório de Microbiologia do DAN pelo cuidado em ter sempre os meios prontos a usar quando eu chegava ao laboratório;

À Dra. Isabel Barroso e D. Lídia Joaquim da Universidade Lusófona pela abertura, apoio total e incondicional, disponibilidade dos laboratórios e boa vontade sempre;

Às Sras. D. Maria do Carmo Alves e D. Catarina Cruz por todo o apoio e simpatia;

Aos colegas do grupo *Diseases and Stress Biology* em especial às Doutoradas Regina Freitas e Ana Cristina Ribeiro pela forma amistosa com que me integraram no grupo;

A toda a minha família, aos que estão e aos que já partiram, todos têm um papel especial na pessoa que sou hoje;

A todos os meus amigos, pela cor que dão à minha vida, que são parte do Ser que EU SOU, aos que partilham tudo ou alguma coisa, aos especiais e aos menos especiais, aos mais novos e aos mais velhos, aos antigos e aos recentes, todos são importantes todos são companheiros de viagem. A todos, folhas da minha árvore, os mais sinceros e permanentes agradecimentos...

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi identificar novos agentes antimicrobianos, biológicos e com benefícios para a saúde humana, que possam ser utilizados na desinfecção de saladas e na indústria alimentar. Para este efeito, foram utilizados, como material biológico, óleos essenciais (OE) de várias espécies, conhecidos por possuírem terpenóides e compostos fenólicos bioativos e soro de queijo fermentado, constituído principalmente por ácido láctico e polipéptidos bioativos.

A concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) determinadas para os OE estudados, foram muito elevadas para o objetivo de aplicação pretendido variando entre 0,03-900 e 3,52-56,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respetivamente.

Foi estabelecido um protocolo de fermentação de soro de queijo industrial, com uma mistura de bactérias lácticas mesófilas, durante 6 dias. Este soro revelou atividade antimicrobiana contra várias espécies de bactérias patogénicas e uma capacidade de desinfecção, em solução a 75 % (v/v) melhor ou equivalente à da solução de cloro a 110 ppm quando aplicado na desinfecção de alfaces de produção biológica.

Os resultados também mostraram que a atividade antibacteriana se deve à sinergia entre o ácido láctico e os péptidos formados por fermentação e proteólise. Os resultados obtidos apontam este soro como uma alternativa viável e saudável como agente antibacteriano e fonte de péptidos bioativos com potencial não só para a indústria, como para a medicina e a nutracêutica.

**Palavras-chave:** soro; bactérias lácticas; péptidos bioativos; desinfecção de vegetais, inibição.

# Characterization of Agents with Antimicrobial Potential for use in Food Industry

## Abstract

The aim of this work was to identify new antimicrobial, biological agents with benefits to the human health, which may be used for disinfecting salads and in the food industry. For this purpose, we used as biological material essential oils (EO) from different plants, known to contain terpenoids and bioactive phenolic compounds, and fermented cheese whey, mainly composed by lactic acid and bioactive polypeptides.

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) determined for the studied EO, were too high, ranging from 0.03-900 and 3.52-56.2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectively, for the purpose of the intended application.

A fermentation protocol for industrial whey was established, with a mixture of lactic bacteria, and with the duration of 6 days. This whey showed antimicrobial activity against several species of pathogenic bacteria and when it was used at 75 % (v/v) dilution, as a disinfecting agent applied to lettuce, it showed better or similar results when compared to a 110 ppm chlorine solution.

Our results also showed that the observed antibacterial activity was due to a synergy between lactic acid and bioactive peptides formed by fermentation and proteolysis. The results point out that fermented whey can be a viable and healthy alternative as an antibacterial agent and a source of bioactive peptides with high potential not only for the food industry, but also for medicine and nutraceuticals.

**Key words:** whey; lactic acid bacteria; bioactive peptides; vegetable disinfection; inhibition

## Índice Geral

Agradecimentos .....	ii
Resumo.....	iv
Abstract .....	v
Índice Geral .....	vi
Índice de tabelas .....	xi
Índice de figuras .....	xii
Lista de abreviaturas .....	xiii
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1. Introdução .....	2
1.1. Os produtos hortofrutícolas minimamente processados .....	2
1.1.1. Fases do processamento dos hortofrutícolas minimamente processados.....	4
1.2. A problemática da contaminação dos produtos hortofrutícolas minimamente processados .....	6
1.2.1. As principais fontes de contaminação microbiológica .....	6
Contaminação pelo solo .....	8
Contaminação por água de rega .....	8
Contaminação por insetos.....	9
Contaminação por manipulação humana .....	9
1.2.2. Principais tipos de contaminação.....	10
Microrganismos indicadores de qualidade .....	10
Microrganismos patogénicos e Doenças com Origem nos Alimentos .....	12
1.3. Soluções possíveis: principais metodologias de descontaminação e problemas associados .....	15
Desinfeção com cloro .....	16
Outros métodos químicos de desinfeção.....	17
Métodos Físicos de desinfeção .....	18
1.4. A utilização de desinfetantes naturais como alternativa de descontaminação de Hortofrutícolas Minimamente Processados .....	18
1.4.1 Os óleos essenciais como desinfetantes naturais .....	19
Composição dos óleos essenciais.....	20
Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	22
Utilização dos óleos essenciais nos produtos alimentares .....	24
1.4.2. O soro de queijo como desinfetante natural .....	25
Processo de fabrico .....	26



Caracterização do soro de queijo .....	26
Caracterização proteica .....	27
Aspetos económicos relevantes do soro do leite .....	27
Um problema ambiental .....	28
A fermentação como estratégia para aumentar o potencial antibacteriano do soro .....	29
A fermentação láctica e a produção de compostos antibacterianos.....	29
Ácido láctico .....	33
Os péptidos antibacterianos .....	34
1.5. As características de um bom desinfetante .....	36
2. Objetivos e Estrutura do Trabalho .....	37
Referências Bibliográficas .....	40
CAPÍTULO 2: .....	62
Essential oils as antibacterial agents against food-borne pathogens: are they really as good as they seem? .....	63
Abstract .....	64
1. Introduction.....	65
2. Material and Methods.....	66
2.1. Bacterial strains and preparation of cultures.....	66
2.2. Essential oil.....	67
2.3. Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration determinations..	67
2.4. Statistical analysis.....	67
3. Results and discussion.....	68
4. Conclusion .....	77
Acknowledgments .....	77
References.....	77
CAPÍTULO 3: .....	83
<b>Este capítulo encontra-se sob CONFIDENCIALIDADE de acordo com o nº 1 do artigo 17º do Regulamento nº 539/2015 de 12 de agosto.</b>	
An improved strategy to enhance the biological potential of fermented whey as a revalorization strategy for industrial food waste .....	84
Abstract .....	85
1. Introduction.....	86
2. Materials and Methods .....	87
2.1. Microorganisms and media.....	87
2.2. Characterization of whey samples .....	87
2.3. Whey fermentation conditions .....	88

2.4. Antibacterial activity .....	88
2.4.1. Well-diffusion assay .....	88
2.4.2. Minimum inhibitory concentrations .....	88
2.4.3. Comparison of the effect of solutions of whey and of lactic acid .....	89
3. Statistical analyses.....	89
4. Results and discussion.....	89
4.1. Lactic acid production during whey fermentation .....	89
4.2. Antibacterial activity during whey fermentation .....	90
4.3. Six days fermented whey presents antibacterial activities which are dose-dependent.....	91
4.4. Fermented whey antibacterial activities are not solely due to lactic acid.....	92
5. Conclusion .....	94
Acknowledgments .....	94
References.....	95
CAPÍTULO 4: .....	98
Preliminary Study on the Effect of Fermented Cheese Whey on <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7, and <i>Salmonella</i> Goldcoast Populations Inoculated onto Fresh Organic Lettuce .....	99
Abstract .....	100
Introduction.....	101
Materials and Methods .....	102
Bacterial strains and culture preparation .....	102
Sample inoculation .....	102
Preparation of washing solutions.....	102
Microbiological analyses .....	103
Statistical analysis.....	103
Results and Discussion .....	103
Acknowledgments .....	105
References.....	106
CAPÍTULO 5: .....	109
Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce .....	110
Abstract .....	111
1. Introduction.....	112
2. Materials and Methods .....	113
2.1. Characterization of whey .....	113
2.1.1 Samples .....	113
2.1.2. Chemical analyses .....	113

2.1.3. Bacteriological and mycological analyses .....	114
2.2. Lettuce variety.....	114
2.3. Assays of whey fermentation.....	114
2.4. Preparation of sanitizer solutions .....	114
2.5. Sanitation procedure.....	114
2.6. Evaluation of the effect of sanitizers.....	115
3. Results and discussion.....	115
Acknowledgments.....	118
4. References.....	119
CAPÍTULO 6: .....	122
Impact of a new postharvest disinfection method based on fermented cheese whey on the organoleptic profile of minimally processed lettuce .....	123
Abstract .....	124
1. Introduction.....	125
2. Material and Methods.....	127
2.1. Fermented whey .....	127
2.2. Experimental design .....	127
2.3. O <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub> contents.....	128
2.4. pH measurement.....	128
2.5. Texture analysis.....	128
2.6. Color measurement.....	129
2.7. Sensory evaluation .....	129
2.9. Statistical analysis.....	129
3. Results and Discussion .....	130
3.1. Quality markers in lettuce.....	130
3.1.1. O <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub> measurements.....	130
3.1.2. pH measurment.....	130
3.1.3. Texture.....	131
3.1.4. Color measurement.....	132
3.1.5. Sensory evaluation.....	133
3.2. Microbial markers .....	134
3.2.1. Aerobic Microorganisms at 30 °C.....	134
3.2.2. Psychrotrophic Microorganisms.....	134
3.2.3. Lactic Acid Bacteria.....	135

4. Conclusion .....	136
Acknowledgments.....	136
References.....	138
<b>CAPÍTULO 7: .....</b>	<b>142</b>
<b>Este capítulo encontra-se sob CONFIDENCIALIDADE de acordo com o nº 1 do artigo 17º do Regulamento nº 539/2015 de 12 de agosto.</b>	
Cheese-whey fermentation produces an antibacterial casein-derived peptide.....	143
Abstract .....	144
1. Introduction.....	145
2. Material and Methods.....	146
2.1. Lactic Acid Bacteria and media.....	146
2.2. Whey fermentation conditions .....	146
2.3. Evaluation of fermentation .....	147
2.4. Analysis of proteolysis during the fermentation process.....	147
2.5. Protein quantification .....	148
2.6. Peptide isolation through ultrafiltration .....	148
2.7. Peptide separation through High-Performance Liquid Chromatography .....	148
2.8. Antibacterial activity of isolated peptides.....	148
2.9. Mass spectrometry analysis .....	149
2.10. Peptides identification .....	149
2.11. Statistical Analysis .....	149
3. Results and Discussion .....	150
3.1. Proteolysis varies throughout fermentation.....	151
3.2. HPLC peptide profile throughout the 6-day fermentation.....	153
3.3. Antibacterial peptide isolation and identification.....	158
4. Conclusions.....	159
5. References .....	160
<b>CAPÍTULO 8: CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>164</b>
Considerações Finais .....	165
<b>ANEXO: PRÉMIO, PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÃO.....</b>	<b>167</b>
1. Prémio .....	168
2. Artigos .....	168
3. Comunicações .....	168

## Índice de tabelas

Tabela 1. Fatores envolvidos na emergência de produtos frescos como fontes de Doenças de Origem Alimentar (Adaptado de Brandl, 2006) .....	7
Tabela 2. Contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em alface e saladas embaladas .....	11
Tabela 3. Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> / coliformes e percentagem de amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> (percentagem com nível superior a 2 log ufc. g <sup>-1</sup> ) .....	12
Tabela 4. Amostras de frutos e vegetais analisadas para os 3 patogénicos mais importantes - dados da Europa (Fonte: EFSA, 2015).....	13
Tabela 5. Percentagem de surtos atribuídos a frutos e vegetais por agente em 2014 na Europa (Fonte: EFSA, 2015).....	14
Tabela 6. Componentes maioritários de alguns óleos essenciais (Adaptado de Lorenzetti <i>et al.</i> , 2011) .....	21
Tabela 7. Termos utilizados para definir a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (Fonte: Burt, 2004).....	24
Tabela 8. Composição típica do soro "doce" e do soro "ácido" (% m/v) (Adaptado de Jelen, 2011; Prazeres <i>et al.</i> , 2012).....	26
Tabela 9. Principais proteínas do soro e suas características físico-químicas (Adaptado de Madureira <i>et al.</i> , 2007).....	27
Tabela 10. Atividade e origem dos péptidos bioativos do leite (Adaptado de Pellegrini <i>et al.</i> , 1999; Chatterton <i>et al.</i> , 2006; Choi <i>et al.</i> , 2012).....	35

## Índice de figuras

Figura 1. Exemplos de produtos hortofrutícolas minimamente processados (Fonte: autora).....	3
Figura 2 Fontes de contaminação em hortofrutícolas durante a produção e no pós-colheita (Adaptado de Zaho, 2005).....	10
Figura 3. Distribuição (%) dos casos estimados de Doença de Origem Alimentar e mortes por categoria de alimentos nos EUA no período de 1998-2008 (Fonte: Painter <i>et al.</i> , 2013; CDC, 2014).....	15
Figura 4. Representação esquemática da entrada e permanência dos microrganismos patogénicos no ciclo de vida das plantas (Brandl, 2006) .....	17
Figura 5. Estrutura química de alguns dos constituintes dos óleos essenciais (Adaptado de Hyldgaard <i>et al.</i> , 2012).....	23
Figura 6. Evolução da produção de queijo em Portugal no período 2005-2013 (Fonte: FAO, 2015a) .	28
Figura 7. Utilização de leite inteiro UE, 2013 (Fonte EUROSTAT, 2016) .....	28
Figura 8. Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA (Fonte: O'Sullivan, <i>et al.</i> , 2011) .....	31

## Lista de abreviaturas

ALA:	$\alpha$ -lactalbumina
BAL:	Bactérias do ácido láctico
BLG:	$\beta$ -lactoglobulina
BPA:	Boas Práticas Agrícolas
CAM:	Contagens de microrganismos aeróbios mesófilos
CBO:	Carência bioquímica de oxigênio
CDC:	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMI:	Concentração mínima inibitória
CBO	Carência biológica de oxigênio
CQO:	Carência química de oxigênio
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DOA:	Doença com Origem nos Alimentos
ECDC:	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EFSA:	<i>European Food Safety Authority</i>
FAO:	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS:	<i>Generally recognized as safe</i>
HACCP:	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
HMP:	Hortofrutícolas minimamente processados
HUS:	Síndrome Hemolítico Urémico
Ig:	Imunoglobulina
LF:	Lactoferrina

Log:	Logaritmo de base 10
LP:	Lactoperoxidase
MP:	Minimamente Processado
OMS:	Organização Mundial de Saúde
SA:	Albumina do soro
ufc:	Unidades formadoras de colónias
UK:	Reino Unido
VTEC:	Grupo patogénico de <i>Escherichia coli</i> – produtor de toxinas vero



# **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

As sociedades modernas sofreram profundas alterações de ordem económica, social, demográfica, cultural e alimentar, existindo hoje em dia, para a maioria das populações, uma relativa abundância de alimentos (Kennedy & Busta, 2007). Atualmente, a agitação da vida moderna e a plena participação da mulher no mercado de trabalho, implicam um menor dispêndio de tempo na preparação de refeições fazendo com que os consumidores dêem preferência a alimentos que sejam saudáveis e, simultaneamente, de preparação fácil e rápida (Ragaert, Verbeke, Devlieghere & Debevere 2004; Buckley Cowan & McCarthy, 2007; Raymundo, 2009; Santos & Oliveira, 2012). Adicionalmente, a exigência é expressa igualmente em termos de uma elevada qualidade sensorial e segurança, preferencialmente, sem aditivos (Rico, Martín-Diana, Baratb & Barry-Ryan, 2007; Adam & Moss, 2008). Assim, hoje em dia encontra-se à disposição dos consumidores uma enorme panóplia de alternativas de alimentos já preparados refrigerados, com uma maior vida útil (período em que o alimento mantém integras todas as suas características originais de qualidade e segurança) (Ragaert *et al.*, 2004; Ragaert, Devlieghere & Debevere, 2007; Wales, 2009). Embora tenham sido sujeitos a algum tipo de tratamento mantêm as características de produto fresco, objetivo que é conseguido através da aplicação de técnicas de preservação ligeira como a refrigeração, o aquecimento moderado, a embalagem em atmosfera modificada bem como a utilização de sistemas antimicrobianos. Estes novos estilos de vida e exigências por parte dos consumidores por alimentos frescos, sem adição de conservantes e com prazo de validade alargado promoveram uma rápida resposta por parte da indústria alimentar tendo assim surgido uma nova gama de produtos, os alimentos minimamente processados (MP) (Ragaert *et al.*, 2004; Buckley *et al.*, 2007). Nesta nova gama de produtos, encontram-se os vegetais frescos cortados, a carne e o peixe comercializados já embalados, prontos para consumo, para maior facilidade e comodidade (Juneja, 2003). Hoje em dia, verifica-se que este tipo de produtos que surgiram para responder às novas tendências do mercado apresentam uma aceitação cada vez maior (Santos & Oliveira, 2012).

### 1.1. Os produtos hortofrutícolas minimamente processados

É amplamente reconhecido que os frutos e vegetais são parte essencial de uma dieta saudável. A importância deste tipo de alimentos na saúde das sociedades assumiu um papel de relevância nas últimas décadas, visto que representam uma importante fonte de vitaminas, minerais, fibras e antioxidantes, havendo evidências de que o seu consumo ajuda a prevenir doenças, como diabetes tipo 2, diversos tipos de cancro e cardiopatias coronárias (Ruiz-Cruz & Arvizu-Medrano, 2010; Boeing *et al.*, 2012; Olaimat & Holey, 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS), assim como as entidades

responsáveis pela saúde de vários países do mundo, começaram a estimular o consumo de frutos e vegetais na ordem de 400 g diárias, o correspondente a 5 porções individuais (WHO, 2004 e 2016).

Os vegetais e/ou frutos MP ganham por isso particular interesse, por parte dos consumidores. Entenda-se por hortofrutícolas minimamente processados (HMP), qualquer vegetal ou fruto em estado fresco que tenha sido fisicamente alterado a partir da sua forma original e posteriormente embalado, mas que permaneça num estado fresco e pronto a usar (Gómez-López, Ragert, Debevere, & Dvlieghere, 2008; Cenci, 2011) (Figura 1).



Figura 1 - Exemplos de produtos hortofrutícolas minimamente processados (Fonte: <http://www.alternainsieme.net/?s=agronomia>)

Este tipo de produtos vêm simplificar a vida e a preparação de refeições saudáveis, apazíveis e diversificadas ao permitirem ganhar tempo e diminuir o desperdício, uma vez que o consumidor apenas leva para casa a parte edível do produto, preparada para consumo imediato. Nos EUA, as vendas de frutos e vegetais MP, crescem aproximadamente \$15 mil milhões por ano e constituem 15 % das vendas de todos os produtos vegetais. O produto mais vendido é a salada pronta a consumir cujas vendas aumentaram de \$2,7 para \$3,2 mil milhões entre 2001 e 2003. Na Europa o consumo varia muito entre países sendo que o Reino Unido é o maior consumidor tendo ultrapassado as 120.000 toneladas de vendas em 2004 (Minter & Foley, 2006; Rojas-Graü, Garner & Martin-Belloso, 2010). Portugal não foge a esta tendência de consumo crescente visto que, no decurso de 2008, a venda de vegetais MP atingiu os 16 milhões de euros. O mercado deste tipo de produtos representa atualmente 15 % das vendas totais de frescos. O crescimento reflete-se sobretudo em saladas mistas (41 %) e verduras (51 %) (Iberian Salad, comunicação pessoal).

### 1.1.1. Fases do processamento dos hortofrutícolas minimamente processados

As diferentes fases de processamento das saladas envolvem várias etapas:

#### *Colheita*

As matérias-primas para a preparação de HMP devem ser de primeira qualidade e de cultivares selecionadas. A colheita é efetuada manualmente ou com recurso a máquinas agrícolas, de modo a danificar o menos possível os tecidos vegetais. (Francis, Thomas & O'Brien, 1999; Moldão & Empis, 2000; Cenci, 2011)

#### *Transporte e Receção*

O transporte para a unidade transformadora deve ser feito o mais rapidamente e sob condições de temperatura o mais baixo possível. Como na colheita, o transporte deve ser realizado de forma a evitar danos mecânicos. Aquando da receção há que avaliar a cultivar, o grau de maturação, a homogeneidade do lote, calibre e aspeto geral (Moldão & Empis, 2000; Cenci, 2011).

#### *Pré-Arrefecimento*

Esta operação tem como objetivo manter a turgescência dos tecidos e minimizar perdas vitamínicas (Francis *et al.*, 1999; Moldão & Empis, 2000).

#### *Escolha e calibração*

Esta operação tem como objetivo retirar todo o material vegetativo estranho ou de qualidade deficiente, onde devem ser removidas as folhas externas ou superfícies mais sujas de forma a reduzir a contaminação inicial (Francis *et al.*, 1999; Cenci, 2011). Os materiais a separar podem ser partes vegetais estranhas, outras cultivares ou materiais não vegetais que possam estar presentes. A calibração visa formar lotes de dimensões mais homogéneas (Moldão & Empis, 2000).

#### *Pré – lavagem*

Nesta operação a água utilizada deve ser potável e tem como objetivo retirar alguns detritos que possam estar aderentes aos vegetais (Moldão & Empis, 2000; Cenci, 2011).

### *Preparação*

A preparação varia em função da matéria-prima e do produto final pretendido. As operações de preparação podem ser divididas em dois tipos: (1) operações de separação e (2) operações de redução de dimensões. Como exemplo de operações de separação, temos o descasque de raízes, bolbos e frutos. No caso da redução de dimensões, se a estrutura vegetal a preparar for constituída por folhas, como na alface, estas podem sofrer operação de corte em pedaços, lâminas ou fatias ou ripagem. A redução de dimensões constitui uma operação delicada (Moldão & Empis, 2000) podendo assim causar efeitos fisiológicos como a produção de etileno, o aumento da respiração, a deterioração de membranas, perda de água, aumentar a suscetibilidade para desenvolvimento de microrganismos de deterioração, perda de clorofila, formação de pigmentos, diminuição na acidez, formação de componentes voláteis, amolecimento dos tecidos vegetais, acastanhamento enzimático, lipólise e oxidação lipídica (Rico *et al.*, 2007; Corbo, Speranza, Campaniello, Amato & Sinigagli, 2010; Siddiqui, Chakraborty, Ayala-Zavala & Dhua, 2011).

### *Lavagem e desinfecção*

A operação de lavagem é feita por imersão, seguida de escovagem e acompanhada de jatos de água, a fim de eliminar materiais estranhos aderentes às matérias-primas, tais como poeiras, resíduos de pesticidas e microrganismos responsáveis pela deterioração dos produtos bem como os exsudados celulares que favorecem a multiplicação microbiana. Após a lavagem os produtos são desinfetados habitualmente com água clorada (Francis, *et al.*, 1999; Moldão & Empis, 2000; Gil, Selma, López-Gálvez & Allende, 2009; Francis *et al.*, 2012). Estes procedimentos visam e contribuem para a redução da carga microbiana presente, minimizando também os potenciais microrganismos patogénicos. Contudo, os microrganismos sobrevivem ao processo de desinfecção quando estes não se encontram à superfície do produto. Deste modo, o contacto entre desinfetante e microrganismos pode ser dificultado uma vez que estes podem estar internalizados nos tecidos, presentes em superfícies irregulares ou em biofilmes. Os danos causados na colheita e no transporte podem oferecer espaços de proteção onde os microrganismos podem sobreviver e crescer, dificultando assim também este processo (Gómez-López, *et al.*, 2008).

### *Remoção da Humidade*

Segue-se a etapa de secagem, com recurso a uma centrífuga, com a finalidade de remover o excesso de água favorável ao desenvolvimento microbiano (Moldão & Empis, 2000).

### *Acondicionamento*

Os vegetais MP são embalados em embalagens semipermeáveis (Rico *et al.*, 2007) ou atmosfera modificada (Moldão & Empis, 2000), o que permite retardar a degradação da qualidade e evita a recontaminação pós-processamento (Francis *et al.*, 1999).

## **1.2. A problemática da contaminação dos produtos hortofrutícolas minimamente processados**

Os alimentos MP não são produtos estéreis. Pelo contrário, apenas ocorre uma diminuição moderada da microbiota presente durante o processamento. Uma vez que os vegetais são produtos crus de origem agrícola é expectável que os HMP contenham microrganismos, incluindo patogénicos (Martinez-Sanchez, Allende, Bennett, Ferreres & Gil, 2006; Holden, Pritchard, & Toth, 2009; Karagözü, Ergönül & Özcan 2011). Não é, por isso, coincidência que alguns dos alimentos nutricionalmente mais recomendados sejam também os que apresentam os maiores desafios de conservação e segurança alimentar. As frutas e verduras são fontes potenciais de microrganismos patogénicos, sendo frequentemente incriminadas em doenças de origem alimentar (DOA) em várias partes do mundo. Com efeito, nas últimas décadas, têm ocorrido, com frequência crescente, surtos de toxinfecção alimentar associados ao consumo de frutos e vegetais crus, o que conduziu a um incremento no interesse manifestado por cientistas e autoridades de saúde em investigar os aspetos da segurança alimentar relacionados com a contaminação microbiana de produtos frescos (Brandl, 2006; Fonseca & Ravishankar, 2007; Sagong *et al.*, 2011; Painter *et al.*, 2013).

Na Tabela 1 estão referidos os fatores mais importantes envolvidos na emergência de produtos frescos como fonte de DOA. O maior risco relaciona-se, em parte, com o facto das preparações e distribuições serem intensivas e centralizadas, o que implica maiores probabilidades de ocorrerem más práticas de manipulação e/ou armazenagem. Por outro lado o facto de estes produtos não sofrerem qualquer tratamento térmico durante a produção, processamento ou preparação, intensifica ainda mais a dificuldade em eliminar o risco associado ao consumo de vegetais não cozinhados (Harris *et al.*, 2003; Lynch, Tauxe & Hedberg, 2009; EFSA, 2013).

### **1.2.1. As principais fontes de contaminação microbiológica**

Além da preocupação com microrganismos de deterioração, os hortofrutícolas podem de igual modo ser veículos para a transmissão de doenças provocadas por microrganismos patogénicos. Devido à elevada manipulação a que este tipo de produtos está sujeito e ao incremento do consumo de HMP, tanto em âmbito doméstico quanto institucional, a preocupação com o risco potencial para a saúde

pública tem vindo gradualmente a aumentar, devido à probabilidade de proliferação microbológica. Os vegetais contaminam-se na fase pré-colheita, ainda como planta no campo, durante a colheita e na fase pós-colheita, durante o transporte, processamento e embalagem (Heard, 2002; Francis *et al.*, 2012; Jung, Jang & Matthews, 2014).

Tabela 1. Fatores envolvidos na emergência de produtos frescos como fontes de Doenças de Origem Alimentar (Adaptado de Brandl, 2006)

Mudanças na produção industrial
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intensificação e centralização da produção</li> <li>• Distribuição global dos produtos por cada vez mais longas distâncias</li> <li>• Introdução dos produtos minimamente processados</li> <li>• Aumento da importação dos produtos frescos</li> </ul>
Mudanças nos hábitos de consumo
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento do nº de refeições fora de casa</li> <li>• Aumento de popularidade dos estabelecimentos de venda de saladas</li> <li>• Aumento do consumo de frutas e vegetais frescos e sumos naturais</li> </ul>
Aumento da população de risco (imunocomprometidos)
Aumento da vigilância epidemiológica
Aparecimento de novas metodologias laboratoriais para identificar e relacionar patogénicos
Emergência de patogénicos com baixas doses infecciosas

De um modo geral, a contaminação inicial dos vegetais reflete a microbiota do ambiente em que estes são cultivados (Tauxe *et al.*, 1997; Barth, Hankinson, Zhuang & Breidt, 2009). Esta microbiota é constituída por microrganismos responsáveis por alteração dos produtos, a maior parte dos quais vive aderente aos vegetais durante o ciclo de vida das plantas, mas também pode conter microrganismos patogénicos com significado para a saúde (Heard, 2002). A maioria destes microrganismos naturalmente presentes nos vegetais são bactérias não patogénicas, no entanto, como a maioria destes produtos é cultivado em ambientes naturais, fica suscetível à contaminação por patogénicos (van Overbeek, Franz, Semenov, de Vos, & van Bruggen, 2010). É de salientar a importância do desenvolvimento de estratégias que permitam identificar as fontes de microrganismos patogénicos, de modo a prevenir a contaminação dos vegetais ao longo da cadeia de produção (Jung *et al.*, 2014).

### Contaminação pelo solo

Os microrganismos patogénicos de origem entérica sobrevivem por longos períodos de tempo nas fezes do Homem e animais e podem contaminar terrenos e culturas (Hutchison *et al.*, 2004; Lynch, *et al.*, 2009; Castro-Rosas *et al.*, 2012; Barrera, Blenkinsop & Warriner, 2013; EFSA, 2013; Millner, 2014). Islam, Doyle, Phatak, Millner, & Jiang (2004a) referem que o serovar *Escherichia coli* O157:H7 é capaz de sobreviver por períodos superiores a 7 meses em solos expostos a condições de inverno chuvoso. Por outro lado, a utilização disseminada de adubo orgânico, não completamente compostado, ou mesmo fezes de animais domésticos ou selvagens, para fertilizar e melhorar a estrutura dos terrenos, têm contribuído para propagar estes microrganismos pelo ambiente (Jung *et al.*, 2014). São particularmente vulneráveis culturas que ficam próximas ao solo, como é o caso da alface, visto que podem ser salpicadas com terra durante o cultivo, irrigações ou chuvas fortes (Millner, 2014). Para minimizar o risco de introdução de patogénicos, através do adubo orgânico, é recomendado que decorram pelo menos 120 dias entre a aplicação do estrume e a colheita dos vegetais (FDA, 1998).

### Contaminação por água de rega

Outra fonte de contaminação é a irrigação ou aplicação de pesticidas com água contaminada, tendo sido demonstrado por Guan, Gregory & Richard (2005), que estirpes de *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157H:7 e *Listeria monocytogenes* são capazes de sobreviver em soluções de pesticidas. Esta situação ocorre com mais frequência em locais com escassez de água ou onde são utilizados efluentes para irrigação. Uma vez que os reservatórios naturais de *E. coli* e *L. monocytogenes* são o gado bovino, caprino e ovino, a intensificação da produção animal contribui para o aumento da contaminação ambiental e das águas, por escorrência das zonas de produção. O livre acesso de animais de consumo ou selvagens aos campos cultivados ou às águas de rega constitui também um importante fator a ter em conta, pois podem veicular estirpes de VTEC e outros microrganismos patogénicos (Hanning, Johnson & Ricke, 2008; Gelting, Baloch, Zarate-Bermudez & Selmán, 2011). Em 2005, na Suécia, um surto por *E. coli* O157 portador da VT2 foi associado ao uso de água contaminada de um pequeno riacho (Söderström, Lindberg & Andersson, 2005). Solomon, Potenski & Matthews (2002) referem que *E. coli* O157:H7 contaminou alface no campo de cultivo através de irrigação em *spray* com água contaminada, enquanto Guo, Iersel, Chen, Brackett & Beuchat (2002), comprovaram a contaminação de culturas de tomate regadas com solução nutriente contendo *Salmonella*. A situação é particularmente preocupante, devido às variações nos regimes hídricos verificadas nos últimos anos, em que têm ocorrido sazonalmente cheias, com arrastamento de contaminação fecal e consequente contaminação das culturas. Por outro lado, os verões secos das últimas décadas têm levado ao uso crescente de águas residuais, provenientes de tratamento de efluentes nas explorações agrícolas, para regar culturas de vegetais. Uma vez que *E. coli* e *Salmonella* spp. sobrevivem bem nos sedimentos, a



inundação sazonal dos campos em épocas chuvosas, contribui também para aumentar a contaminação (Islam *et al.*, 2004a; Islam *et al.*, 2004b; FAO, 2008). O uso de esgotos humanos não tratados pode igualmente constituir fonte de muitos patógenos sobretudo *Shigella* spp., *Salmonella* entérica, vários patótipos de *E. coli* e vírus entéricos (Beuchat, 1996, FAO, 2008; Castro-Rosas *et al.*, 2012; Faour-Klingbeil, Mutada, Kuri & Todd, 2016).

#### *Contaminação por insetos*

Os insetos constituem também uma fonte de contaminação para as culturas (EFSA, 2013). As moscas são atraídas para o estrume e podem carregar e transmitir microrganismos patogénicos (Hanning *et al.*, 2008). Experiências efetuadas com a mosca da fruta (*Ceratitis capitata*) contaminada com uma estirpe de *E. coli* marcada com uma proteína fluorescente, demonstraram que este inseto pode transmitir bactérias patogénicas a frutos intactos (Sela, Nestel, Pinto, Nemny-Lavy & Bar-Joseph, 2005). Para além de transmitirem microrganismos patogénicos, os insetos podem danificar os tecidos das plantas destruindo a cutícula cerosa a qual constitui a primeira barreira de defesa, tornando-os mais vulneráveis à penetração dos patógenos (Hanning *et al.*, 2008).

#### *Contaminação por manipulação humana*

Adicionalmente, durante a colheita, as práticas de higiene incorretas dos trabalhadores rurais e a falta de instalações sanitárias, contribuem também para a contaminação destes produtos (Brandl, 2006; Espinoza-Medina *et al.*, 2006; FAO, 2008; Jung *et al.*, 2014).

Na fase de pós-colheita, a contaminação pode ocorrer como resultado do uso de gelo ou água contaminados, más práticas de higiene por parte do pessoal manipulador ou dos consumidores, danos nos tecidos vegetais, equipamentos de transporte, presença de animais ou pragas no ambiente de processamento, uso de equipamento contaminado, contaminações cruzadas ou condições de armazenamento impróprias (Brandl & Amundson, 2008; EFSA, 2011). No que se refere aos vegetais prontos a comer, a maior fonte de contaminação durante o processamento de alface e outros vegetais MP é a etapa de corte (Nguyen-the & Carlin, 2000; Brandl & Amundson, 2008; Barth, *et al.*, 2009) (Figura 2).

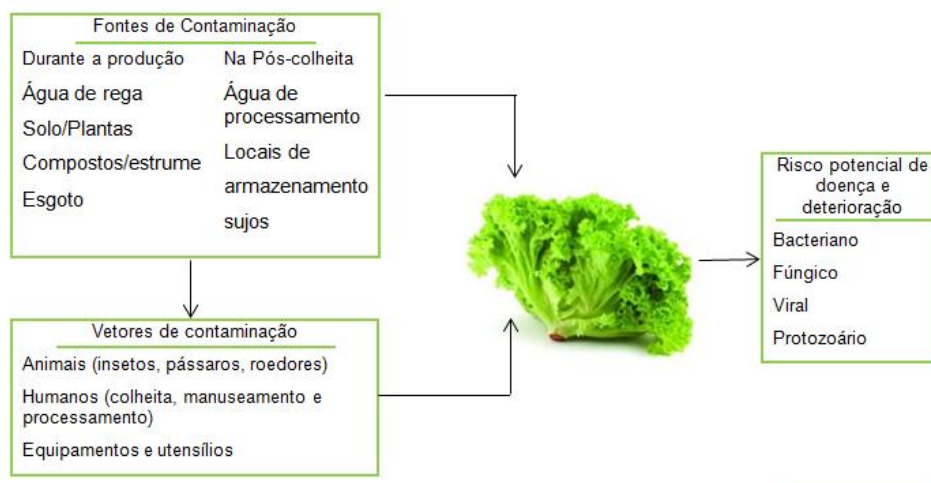


Figura 2 Fontes de contaminação em hortofrutícolas durante a produção e no pós-colheita (Adaptado de Zaho, 2005)

### 1.2.2. Principais tipos de contaminação

Face ao exposto, facilmente se compreende a existência de uma microbiota habitual e natural dos tecidos vegetais que poderá estar presente no momento do consumo, constituindo ou não um problema para a saúde dos consumidores, dependendo da presença de microrganismos patogénicos. Deste modo, temos a considerar a contaminação por microrganismos responsáveis pela deterioração dos produtos e os microrganismos patogénicos responsáveis por DOA.

#### *Microrganismos indicadores de qualidade*

As contagens de microrganismos aeróbios mesófilos ou psicrotróficos e também de *Enterobacteriaceae* e coliformes, uma vez que são ensaios simples de executar, têm sido amplamente utilizados pela indústria de vegetais MP como indicadores de higiene e qualidade, permitindo verificar que o número de microrganismos mesófilos ou psicrotróficos presentes, em saladas cortadas preparadas no momento em que são processadas, é semelhante ao apresentado no produto em natureza (Heard, 2002; Abadias, Usall, Anguera, Solsona, & Viñas, 2008). Os HMP, devido à presença de superfícies de corte, aumento de nutrientes disponíveis, respiração dos tecidos vegetais e o confinamento dentro da embalagem, assim como o facto de não existirem tratamentos que assegurem a estabilidade microbiológica, apresentam uma maior suscetibilidade à multiplicação microbiana do que os produtos *in natura* (Francis *et al.*, 2012; Siroli, Patrignani, Serrazanetti & Tabanelli, 2015). Vários estudos referem que as contagens de mesófilos ou psicrotróficos presentes em alface ou saladas embaladas são muito variáveis situando-se entre 1,0 e 8,9 log ufc.g<sup>-1</sup> (Tabela 2).

Tabela 2. Contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em alface e saladas embaladas

<b>Vegetais frescos cortados</b>	<b>Microrganismos aeróbios mesófilos (log ufc.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
Alface MP	3,0-7,0	Szabo <i>et al.</i> , 2000
Vegetais folhosos MP	1,0->6,0	Fröder <i>et al.</i> , 2007
Vegetais MP	5,7-8,2	Silva <i>et al.</i> , 2007
Vegetais fresco cortados	4,3-8,9	Abadias <i>et al.</i> , 2008
Alface cortada	4,9-7,6	
Vegetais MP	5-9	Badosa <i>et al.</i> , 2008
Saladas folhosas MP (baby)	4-8,7	Caponigro <i>et al.</i> , 2010
Saladas MP	5,0-5,7	Khiyami, 2011
Saladas folhosas MP	4,7-8,5	Santos <i>et al.</i> , 2012
Vegetais MP	4-6,51	Maistro <i>et al.</i> , 2012
Saladas MP	5,5-7,4	Jeddi <i>et al.</i> , 2014
Vegetais cortados MP	5,3-7,5	
Saladas MP	3,0-6,7	Cerna-Cortes <i>et al.</i> , 2015

A maioria das bactérias identificadas em vegetais crus pertence ao grupo de bacilos Gram negativos (80 a 90 %) e incluem *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Flavobacterium* spp., *Xantomonas* spp., *Chromobacterium* spp. e *Alcaligenes* spp. A família *Enterobacteriaceae*, onde se inclui o grupo coliformes, constitui cerca de 10 % dos microrganismos encontrados nas contagens totais (Nguyen-the & Carlin, 2000; Barth *et al.*, 2009; Siroli *et al.*, 2015). Poubol & Izumi (2005), em cubos de manga conservados em atmosfera de CO<sub>2</sub>, referem que a microbiota predominante era de bacilos Gram negativos, dos quais 60 % eram *Enterobacteriaceae*. Assim, níveis elevados destes microrganismos são habituais em HMP e não são indicativos de contaminação fecal, no entanto podem comprometer a sua qualidade sensorial e nutritiva (Santos *et al.*, 2012).

Atualmente a espécie *E. coli* é considerada o melhor indicador de uma possível contaminação fecal (Odonkor & Ampofo, 2013), e muitos estudos publicados referem baixas prevalências bem como baixos níveis deste microrganismo. A Tabela 3 pretende enfatizar o atrás exposto face a estes indicadores. Apresenta resultados referidos na literatura científica de contagens de *Enterobacteriaceae* e coliformes e ainda percentagem de amostras que se revelaram positivas para *E. coli* bem como a percentagem de

amostras em que a contagem foi superior a 2 log ufc g<sup>-1</sup>, valor de referência indicado no Regulamento (CE) N° 2073 (2005).

Tabela 3. Contagem de *Enterobacteriaceae* / coliformes e percentagem de amostras positivas para *Escherichia coli* (percentagem com nível superior a 2 log ufc. g<sup>-1</sup>)

Vegetais frescos cortados	<i>Enterobacteriaceae</i> (E) ou Coliformes (C) Log ufc.g <sup>-1</sup>	<i>Escherichia coli</i> % de positivas (>2log ufc g <sup>-1</sup> )	Referência
Vegetais folhosos MP	1,0->6,0 (E)	-	Froder <i>et al.</i> , 2007
Vegetais MP	0,48-4,38 (C)	28,6 (3,57)	Silva <i>et al.</i> , 2007
Vegetais fresco cortados	<1,0-8,0 (E)	11,4 (0,8)	Abadias <i>et al.</i> , 2008
Alface cortada	<1,0-7,1 (E)	3,4 (-)	
Saladas folhosas MP (baby)	2,0 - 7.2 (C)	27 (0,7-6,6)	Caponigro <i>et al.</i> , 2010
Saladas MP	0,30-4,90 (C)	95,5 (-)	Khiyami, 2011
Saladas folhosas MP	7,2-3,8 (E)	2,65 (0,7>)	Santos <i>et al.</i> , 2012
Vegetais MP	1,0-3,7 (C)	5,81 (1,4-3,5)	Maistro <i>et al.</i> , 2012
Saladas MP	1,9-6,0 (C)	30 (-)	Jeddi <i>et al.</i> , 2014
Vegetais cortados MP	<1,0->5,5 (C)	9,4 (-)	
Saladas MP	<0,48-3,1 (C)		Cerna-Cortes <i>et al.</i> , 2015

### *Microorganismos patogénicos e Doenças com Origem nos Alimentos*

Como já referido, para além dos microrganismos responsáveis pela deterioração dos produtos vegetais há que ter em conta os microrganismos patogénicos transmitidos por estes produtos. Nas últimas 3 décadas a epidemiologia das doenças infecciosas de origem alimentar sofreu alteração radical visto que os produtos vegetais surgiram como novos veículos de transmissão de agentes zoonóticos (Holden *et al.*, 2009). São numerosos os surtos descritos na literatura científica descrevendo situações desta natureza conduzindo à morte de centenas de pessoas (Beuchat, 2002; Lynch *et al.*, 2009; Taban & Halhman, 2011; Olaimat & Holley, 2012; Painter *et al.*, 2013; Siroli *et al.*, 2015). Estirpes de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* são os microrganismos patogénicos que causam mais preocupações em surtos desta natureza (Sagong *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2013).

Na Europa, segundo o *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2014* (EFSA, 2015), publicado pela *European Food Safety Authority* (EFSA) e o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) a frequência de isolamento dos referidos patogénicos em vegetais e frutos, no decurso de 2014, é bastante baixa como se pode ver na Tabela 4.

Tabela 4. Amostras de frutos e vegetais analisadas para os 3 patogénicos mais importantes - dados da Europa (Fonte: EFSA, 2015)

Ano	Microrganismos					
	<i>Salmonella</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>		VTEC*	
2014	Nº de amostras	% +	Nº de amostras	% +	Nº de amostras	% +
	6214	0,3	3272	2,8	1150	0,1
			3485 (contagem)	0,1(>10 <sup>2</sup> )		

\* *E. coli* produtor de verotoxinas

No que se refere a surtos ocorridos durante o ano de 2014, vegetais e frutos foram responsáveis por 7,1 % (n=592) dos surtos ocorridos, o que representou um incremento face a 2013 em que estes produtos foram responsáveis por 4,4 % dos surtos. Na Tabela 5 encontram-se resumidos os surtos ocorridos durante o ano de 2014 com origem no consumo de vegetais e frutos. Como se pode verificar pela observação da tabela, para além dos 3 patogénicos já referidos, existem outros agentes menos frequentes, mas igualmente com impacto na segurança dos produtos vegetais e consequentemente, na saúde dos consumidores.

Convém salientar um surto de grandes proporções, ocorrido entre maio e julho de 2011, pela dimensão que apresentou relacionada com o elevado número de casos a que deu origem e pelas dificuldades em detetar a fonte da infeção. O surto surgiu na Alemanha onde ocorreram 3.816 casos, 845 dos quais desenvolveram síndrome hemolítica urémica (HUS) e 54 faleceram. A maioria dos casos (88 %) que desenvolveram HUS eram adultos contrariamente ao que tem ocorrido em infeções por estirpes VTEC que afetam geralmente crianças. De igual modo, o sexo feminino (com idade entre 30 e 34 anos) foi o mais afetado (68 % de casos com HUS e 58 % de gastroenterite). A estirpe epidémica foi *E. coli* O104:H4 enteroagregativa que adquiriu o bacteriófago de conversão stx2a. Este surto apresentou uma dimensão internacional tendo surgido casos em mais 15 países da Europa e EUA. Em França surgiram 8 casos em pessoas que tinham estado presentes num evento comunitário, sendo que a estirpe isolada nestes doentes apresentava um perfil genético compatível com a estirpe epidémica. Dado tratar-se de um evento comum foi possível identificar o alimento suspeito. As investigações concluíram que o surto foi associado ao consumo de rebentos de feno-grego, cujas sementes, das

quais foi identificado o lote, foram importadas do Egito em 2009 (Frank *et al.*, 2011; WHO, 2011; King *et al.*, 2012; Gossner, de Jong, Hoebe & Coulombier, 2015).

Tabela 5. Percentagem de surtos atribuídos a frutos e vegetais por agente em 2014 na Europa (Fonte: EFSA, 2015)

Ano	Microrganismos						
2014	Norovirus (n=76)	Toxina estafilocócica (n=31)	Toxina de Clostridia (n=42)	<i>B. cereus</i> (n=35)	VTEC* N=38	<i>Campylobacter</i> (n=29)	<i>Salmonella</i> (n=225)
	14,5 %	6,5 %	7,7 %	5,7 %	5,2 %	2,9 %	1,3 %

\* *E. coli* produtor de verotoxinas

Dados dos EUA, estimam que no período entre 1998 e 2008, os frutos e vegetais estiveram na origem de 46 % dos surtos, a maioria dos quais causados por norovirus, *Salmonella* spp e *E. coli* O157:H7, sendo os vegetais folhosos o veículo mais frequente. Estes foram responsáveis por 2,2 milhões de casos por ano, correspondentes a 22 %, constituindo o produto alimentar responsável pelo maior número de doentes. Estima-se ainda que, anualmente, 24.000 pessoas (41 %) são hospitalizadas devido ao consumo de produtos de origem vegetal, dentro dos quais 38 % devido a frutos e vegetais e 16 % por vegetais folhosos, logo após os produtos lácteos que ocupam o 1º lugar em matéria de hospitalizações. Relativamente ao número de mortes, os frutos e vegetais são responsáveis por 333 casos anuais (23 %), muito aquém dos 43 % devidos ao consumo de produtos de origem animal (terrestre). Resumindo, os vegetais folhosos foram responsáveis pelo maior número de doentes (22 %) sendo a segunda causa mais frequente de hospitalizações (14 %) e a quinta causa de morte (6 %) (Painter *et al.*, 2013) (Figura 3).

Presentemente está a decorrer um surto, nos EUA, por *L. monocytogenes*, provocado pelo consumo de vegetais congelados que afetou apenas 8 pessoas das quais 2 já faleceram, o que corresponde a 25 %, estando esta percentagem de acordo com o descrito na literatura da especialidade (CDC, 2016).

Os surtos ocorridos nos últimos anos, nomeadamente em 2011 o que foi provocado por *E. coli* O104:H4 em rebentos vegetais, em 2006 por contaminação de espinafres MP com *E. coli* O157:H7, em 1996 também com *E. coli* O157:H7 em alface, *Salmonella* spp. em tomate, sumo, frutos e rebentos reforça a preocupação com produtos que são consumidos crus e chama a atenção para a necessidade de aumentar as estratégias preventivas (Hilborn *et al.*, 1999; CDC, 2006; CDC, 2008; WHO, 2011; Gault *et al.*, 2011).

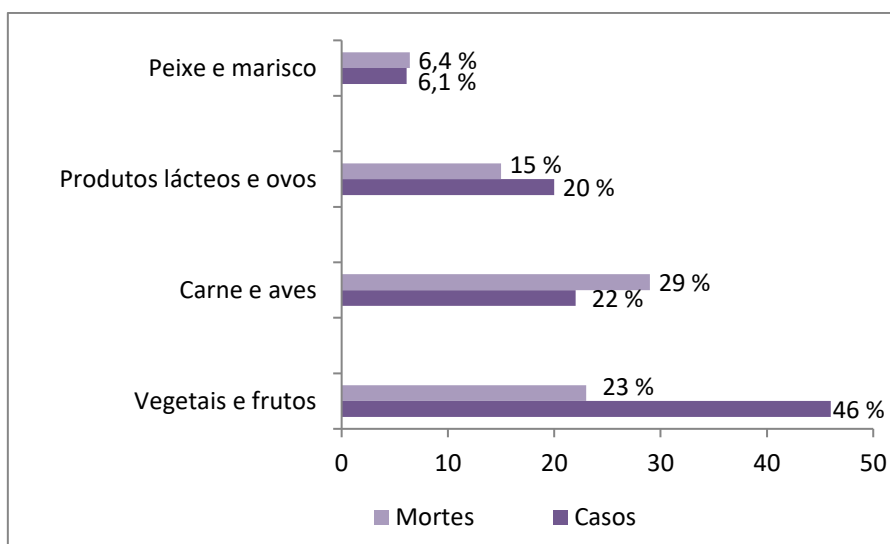


Figura 3. Distribuição (%) dos casos estimados de Doença de Origem Alimentar e mortes por categoria de alimentos nos EUA no período de 1998-2008 (Fonte: Painter *et al.*, 2013; CDC, 2014)

### 1.3. Soluções possíveis: principais metodologias de descontaminação e problemas associados

Na sequência do referido, é importante reforçar que HMP são géneros alimentícios que não apresentam qualquer etapa que garanta a eliminação do risco associado ao seu consumo, isto é, não são sujeitos a um tratamento térmico que assegure a eliminação de patogénicos, esporos e toxinas a níveis seguros. Como consequência, a etapa de sanitização/desinfecção de vegetais, sobretudo nos HMP, é uma etapa crítica para a segurança alimentar. Como já mencionado estes vegetais são cortados e o dano causado às células torna-as mais suscetíveis à multiplicação microbológica e alterações bioquímicas com intensificação das taxas respiratórias e da atividade enzimática (Allende, Tomás-Barberán & Gil, 2006; Ragaert *et al.*, 2007; Caponigro *et al.*, 2010; Francis *et al.*, 2012; Warriner & Namvar, 2013; Siroli *et al.*, 2015)

Pode afirmar-se que a lavagem e desinfecção dos produtos vegetais é moderadamente efetiva, mas não é de modo algum eficaz quando os microrganismos patogénicos apresentam localização interna. Os microrganismos patogénicos podem penetrar os tecidos vegetais, na fase pré-colheita por internalização, ou na fase pós-colheita por infiltração, o que torna a situação bastante mais complexa. O fenómeno da infiltração (efeito de sucção) pode ocorrer quando um produto que se encontra à temperatura ambiente é submerso em água mais fria e o diferencial de temperatura origina bolhas de ar dentro do vegetal que, ao contraírem-se, conduzem à criação de vácuo, sendo então a água sugada e os microrganismos patogénicos, se presentes, para o interior dos tecidos, através de poros, canais ou fissuras (FDA, 1998; Buchanan, 2008; Xia *et al.*, 2012; Warriner & Namvar, 2013). Li, Mehrdad, &

Osburn (2008), comprovaram que a técnica de arrefecimento em vácuo, correntemente usada na indústria de folhosas para aumentar a preservação das propriedades sensoriais de produtos vegetais, reduzindo eficientemente a temperatura ambiente aquando da colheita de cerca de 28 °C para 0 °C, aumenta a infiltração de *E. coli* O157:H7 em 0,5 log ufc.g<sup>-1</sup>. O processo altera as microestruturas dos tecidos da alface favorecendo a infiltração do patogénico e por outro lado, quando a alface contaminada é transferida da câmara de vácuo para a pressão atmosférica normal, é criada uma força de sucção interna que facilita a infiltração de *E. coli* O157:H7. Gómez-López, Marín, Allende, Beuchat, & Gil (2013) conduziram um estudo que comprovou a infiltração de uma estirpe de *Salmonella* Thyphimurium durante as operações de lavagem de espinafres *baby* embora dependente de condições de humidade, temperatura e iluminação. Já a internalização pode ocorrer durante a floração com entrada dos microrganismos patogénicos pelas flores, levados pela água ou por insetos, através das raízes, a partir do solo ou água contaminados, por feridas ou fissuras ou por aprisionamento na película cerosa (Buchanam, 2008). Diversos estudos têm demonstrado laboratorialmente a entrada de patogénicos para os tecidos vegetais quer através de aberturas naturais tais como estômatos, junções das raízes e flores quer através de danos nos tecidos. Uma vez ligados, os microrganismos podem incorporar-se em biofilmes aumentando a sua capacidade de sobrevivência nos tecidos das plantas (Erickson, 2012). Em resumo, a internalização dos microrganismos patogénicos pode ocorrer em qualquer fase do ciclo de vida dos vegetais, (semente, germinação, planta madura, flor, fruto) passando para a fase subsequente (Tauxe, 2008). A Figura 4 pretende demonstrar as portas de entrada dos microrganismos patogénicos e a permanência no seu ciclo de vida. Assim, o contacto entre desinfetante e microrganismos pode ser dificultado uma vez que estes podem estar internalizados no produto, presentes em superfícies irregulares ou em biofilmes. De igual modo, as injúrias causadas na colheita e no transporte, podem oferecer espaços de proteção onde os microrganismos podem sobreviver e crescer, dificultando também o processo de desinfeção (Gómez-López *et al.*, 2008).

#### *Desinfeção com cloro*

Presentemente, os métodos de desinfeção mais utilizados incluem o uso de agentes desinfetantes à base de substâncias cloradas (Gil *et al.*, 2009), que além de serem nocivos para a saúde humana através da formação de compostos carcinogénicos (Martin-Diana, Rico, Frias & Mulcahy, 2006; Siroli *et al.*, 2015), são pouco eficazes, uma vez que o seu poder desinfetante não se mantém cativo durante muito tempo e as populações bacterianas sobreviventes multiplicam-se mais rapidamente do que as correspondentes populações em produtos não desinfetados (Nguyen-the & Carlin, 2000). A água clorada é normalmente utilizada para desinfetar HMP devido ao baixo custo e uso simples (Gil, *et al.*, 2009). A eficácia da descontaminação é refletida na redução obtida, mas mais importante, na manutenção dessa redução durante o tempo de prateleira. No entanto, o cloro ativo não é eficaz e pode ser nocivo para a saúde devido à formação de derivados tóxicos como tri-halometanos e



cloraminas, o que não deixa de ser uma preocupação, uma vez que têm vindo a surgir restrições à sua utilização em diversos países da Europa nomeadamente, Holanda, Suécia, Alemanha, Suíça, Dinamarca e Bélgica (Rico, *et al.*, 2007; Francis, *et al.*, 2012; Siroli *et al.*, 2015). Cardador & Gallego (2012) conduziram um estudo para verificar a presença destes derivados e concluíram que durante a operação de desinfecção, são formados compostos tóxicos ou cancerígenos, designadamente tri-halometanos, que permanecem no produto final.

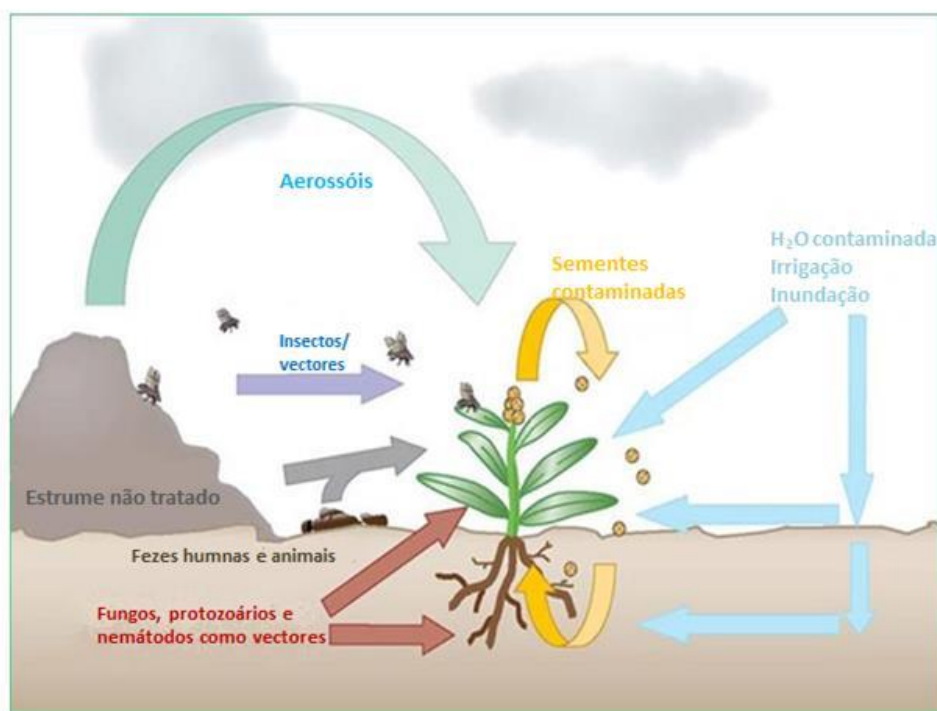


Figura 4. Representação esquemática da entrada e permanência dos microrganismos patogénicos no ciclo de vida das plantas (Fonte: Brandl, 2006)

#### *Outros métodos químicos de desinfecção*

Metodologias baseadas em desinfetantes químicos, como dióxido de cloro (Wu & Kim, 2007), ácidos orgânicos (Beuchat, Adler & Lang, 2004; Bari, *et al.*, 2005; Martinez-Sanchez *et al.*, 2006; Ölmez & Kretzschmar, 2009; Zhang, Ma, Phelan & Doyle, 2009), peróxido de hidrogénio (Lin, Moon, Doyle & McWatters, 2002; Samadi, Abadian, Bakhtiari, Fazeli & Jamalifar, 2009; Gopal, Coventry, Wan, Roginski & Ajlouni, 2010), água eletrolisada (Gómez-López *et al.*, 2007), água ozonada (Beuchat, 1998; Singh, Singh, Bhunia & Stroshine, 2002; Rodgers, Cash, Siddig & Ryser, 2004; Ölmez & Akbas, 2009; Ölmez, 2010). ou soluções à base de cálcio (Rico, Martin-Diana, Heneham, Frias & Barry-Ryan, 2006) têm sido bastante desenvolvidas nos últimos anos. Verificou-se que, de um modo geral, estes métodos eram de fácil aplicação e apresentavam um efeito bactericida forte. No entanto, a maior parte apresentou desvantagem quanto à sua utilização. Por exemplo, a utilização de dióxido de cloro demonstrou ser

eficaz na redução de populações bacterianas, mas acaba por afetar algumas características organolépticas. Outro facto a considerar é a redução drástica da população microbiana nativa que ao diminuir a competição por espaço e nutrientes pode levar a um posterior acréscimo no desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Rico, *et al.*, 2007; Siroli *et al.*, 2015).

#### *Métodos Físicos de desinfeção*

Tratamentos físicos como radiações ionizantes (Minter & Foley, 2006; Sagong *et al.*, 2011), ultravioletas (Birmppaa, Sfikab, Vantarakise, 2018), infravermelhas ou embalagens de atmosfera modificada (Rico, *et al.*, 2007) foram também bastante desenvolvidos nos últimos anos, com objetivo de preservar este tipo de produtos. A embalagem de atmosfera modificada é uma técnica atualmente em uso na indústria. Estes métodos podem ser bacteriostáticos ou bactericidas, e mostraram alta eficiência na inibição de contaminações microbianas (Rico, *et al.*, 2007), no entanto apresentam problemas, por exemplo, o processo de irradiação não pode ser utilizado de forma isolada como um passo de lavagem contínua, uma vez que por si só não remove resíduos químicos ou solo (Goodburn & Wallace, 2013).

### **1.4. A utilização de desinfetantes naturais como alternativa de descontaminação de Hortofrutícolas Minimamente Processados**

Cada vez mais os consumidores preferem produtos naturais e/ou minimamente processados com baixos níveis de aditivos químicos, no entanto com um tempo de vida útil prolongado. A legislação alimentar restringiu o uso de alguns antimicrobianos sintéticos com base na sua possível toxicidade para os consumidores. Como consequência dos problemas inerentes aos processos de desinfeção atuais, torna-se premente a identificação de substâncias antibacterianas alternativas, de preferência de origem biológica, que sejam mais eficazes e inócuas para a saúde humana e para o ambiente. Assim sendo, o uso de compostos antibacterianos naturais, tem-se mostrado uma alternativa promissora, aumentando o interesse nestes compostos, visando a eliminação de microrganismos patogénicos devido à resistência que estes têm vindo a desenvolver contra antibióticos (Gachkar *et al.*, 2007; Souza Stamford, Lima & Trajano, 2007, Barbosa *et al.*, 2009; Sagong *et al.*, 2011; Hayek, Gyawali & Ibrahim, 2013; Gyawali & Ibrahim, 2014).

Diversos estudos foram realizados a fim de explorar novos métodos de desinfeção. A maior parte destes teve como objetivo a eliminação tanto dos patogénicos, como dos microrganismos responsáveis pela degradação dos produtos hortofrutícolas (Martin-Diana *et al.*, 2006; Goodburn & Wallace, 2013). Torna-se também necessário estudar técnicas que descontaminem o produto, mas

que explorem vias para manter a microbiota em níveis baixos ao longo do tempo de prateleira (Rico, *et al.*, 2007).

As principais fontes destes compostos são as plantas (óleos essenciais), microrganismos, nomeadamente bactérias lácticas (ácido láctico e polipéptidos antimicrobianos) e animais (lisozima) (Rizello *et al.*, 2005; Gyawali & Ibrahim, 2014). Os compostos bioativos antibacterianos são substâncias produzidas por organismos vivos na sua luta contra outros organismos, pelo espaço e /ou nutrientes. Uma vez que estes produtos naturais e os seus componentes são geralmente aceites como seguros (*Generally recognized as safe* - GRAS) a preocupação com a segurança do seu uso na prevenção do desenvolvimento de microrganismos patogénicos de origem alimentar ou de alteração é mínima. Nas últimas décadas têm emergido soluções alternativas de compostos com estas características, com potencial para desinfeção alimentar. Alguns exemplos são o ácido acético, o ácido ascórbico, o ácido láctico, óleos essenciais, soro do queijo, entre outros. Contudo, poucos são os desinfetantes propostos nos estudos científicos que chegam ao mercado, pelo que se continua a utilizar os métodos químicos mais tradicionais, como os compostos clorados, apesar dos conhecidos prejuízos para a saúde. Torna-se portanto premente o desenvolvimento de um produto desinfetante natural que consiga igualar ou suplantar os resultados obtidos pelos produtos à base de cloro, mas que não apresente os seus inconvenientes para a saúde e para o ambiente e que por outro lado mantenha as características organoléticas do produto, sem interferir com o seu valor alimentar.

#### **1.4.1 Os óleos essenciais como desinfetantes naturais**

Desde tempos remotos que as propriedades antimicrobianas de plantas e especiarias têm sido exploradas como conservantes de alimentos (Burt, 2004; Oussalah, Caillet, Saucier & Lacroix, 2006; De Martino, De Feo, Formisano, Mignola & Senatore, 2009; Rožman & Jeršek, 2009; Tian *et al.*, 2011), tendo o interesse científico nesta área reemergido nas últimas décadas (Patrignani., Siroli, Serrazanetti, Gardini, & Lanciotti, 2015). Os óleos essenciais resultam do metabolismo secundário das plantas aromáticas e apresentam como características básicas o intenso odor, sendo que são extremamente voláteis e hidrofóbicos (Lubbe & Verpoorte, 2011). São produzidos por estruturas excretoras especializadas, as quais podem ser externas, tricomas secretores e osmóforos, ou internas, canais e bolsas, podendo ser encontradas em várias partes destas plantas, nomeadamente, folhas, frutos, flores, gomos, sementes, ramos, cascas, raízes e caules, sendo que a sua composição pode variar consoante a sua localização (Christaki, Bonos, Giannenas & Florou-Paneri, 2012).

Na natureza estes metabolitos apresentam duas funções distintas, por um lado protegem as plantas contra pragas ou infecções através da sua ação inseticida, antibacteriana e antifúngica, por outro atraem determinados insetos para que estes retirem da planta o seu pólen facilitando a polinização (Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008). A quantidade e composição podem variar tanto a nível genético e fisiológico, como também devido a fatores externos, entre os quais, condições de cultivo, colheita, condições pós-colheita, fatores ambientais, entre outros (Lubbe & Verpoorte, 2011; Costa, Deschamps, Côcco, & Scheer, 2014).

A utilização dos OEs é frequente na cultura popular, mas com a introdução dos medicamentos de síntese a sua utilização caiu em desuso. Nas últimas décadas, o interesse nestes óleos e compostos tem vindo a aumentar com o objetivo de investigar as suas atividades. A atividade biológica que tem merecido maior destaque é a atividade antimicrobiana, uma vez que os OE apresentam o potencial de inibir o crescimento microbiano.

#### *Composição dos óleos essenciais*

A composição de um OE pode variar devido a vários fatores como a composição do solo onde é cultivado, do órgão da planta de onde é extraído, da época do ano em que é colhido, da idade (Faleiro *et al.*, 2003; Bakkali *et al.*, 2008) e também do método de extração que é aplicado (Burt, 2004). A diferença na composição de óleos essenciais resulta em diferentes respostas na atividade antimicrobiana, quando são testados nas mesmas condições. Assim sendo, torna-se importante a obtenção e extração de forma padronizada de modo a obter OE de composição constante (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008). Os OE podem ser constituídos por mais de 60 compostos que se dividem em componentes principais, podendo representar mais de 85 % do óleo, e em compostos presentes em quantidades vestigiais (Burt, 2004).

Os OE têm uma composição extremamente complexa, podendo ter entre dezenas a centenas de compostos, sendo geralmente o constituinte em maior concentração (maioritário) aquele que confere a atividade biológica do óleo essencial, no entanto, muitas vezes essa atividade resulta do sinergismo entre vários (Burt, 2004; Hyldgaard, Mygind & Meyer, 2012; Lubbe, Kashif, Choi & Verpoorte, 2013). Num estudo efetuado no controle de *Botrytis cinerea* com recurso a diversos OE foi comprovado que, na maioria dos casos, apresentavam maior atividade fungicida aqueles que apresentavam maior concentração do constituinte maioritário (Lorenzetti *et al.*, 2011). A Tabela 6 mostra a variedade dos componentes principais de alguns óleos essenciais mais conhecidos.

Tabela 6. Componentes majoritários de alguns óleos essenciais (Adaptado de Lorenzetti *et al.*, 2011)

Nome Vulgar	Nome Científico	Componente Maioritário	2º Componente	3º Componente	4º Componente	5º Componente
<b>Poaceae</b>						
Erva Príncipe	<i>Cymbopogon citratus</i>	Geranial (38,67 %)	Neral (32,40 %)	Myrceno (13,88 %)	Geraniol (2,79 %)	Verbenol (1,32 %)
Citronela	<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronelal (23,7 %)	Geraniol (16,48 %)	Oct-7-enol (13,88 %)	Elemol (5,14 %)	Citronelil isobutirato (4,89 %)
Palmarosa	<i>Cymbopogon martini</i>	Geraniol (73,86 %)	Geranil Acetato (27,65 %)	Linalol (12,14 %)	E- $\beta$ -ocimene (3,77 %)	$\alpha$ -himachalene (1,46 %)
<b>Myrtaceae</b>						
Eucalipto	<i>Corymbia citriodora</i>	Citronelal (30,45 %)	Oct-7-enol (15,23 %)	Isopulegol (13,83 %)	Fenchyl acetato (8,43 %)	Eucaliptol (2,71 %)
Melaleuca	<i>Malaleuca alternifolia</i>	Terpinen-4-ol (26,64 %)	$\gamma$ terpineno (8,81 %)	Eucaliptol (5,67 %)	$\alpha$ terpineno (6,07 %)	Cimeno (5,45 %)
Cravo	<i>Syzygium zeilanicum</i>	Eugenol (77,81 %)	$\alpha$ humuleno (14,56 %)	$\delta$ cadineno (3,03 %)	Óxido Cariofileno (1,43 %)	
<b>Lauraceae</b>						
Canela	<i>Cinnamomum zeilanicum</i>	Eugenol (53,38 %)	$\alpha$ himachaleno (9,44 %)	Biciclogermacreno (7,61 %)	Linalol (3,47 %)	Nerolidol (3,08 %)
<b>Lamiaceae</b>						
Menta	<i>Mentha pipertita</i>	Mentol (38,14 %)	Mentona (36,96 %)	Menthyl acetato (7,17 %)	$\alpha$ himachaleno (5,36 %)	Eucaliptol (4,96 %)
Lavanda	<i>Lavandula hybrida</i>	Octil Acetato (21,00 %)	Linalol (15,03 %)	Isobornil acetato (11,26 %)	Canfora (11,16 %)	$\alpha$ himachaleno (6,86 %)
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Eucaliptol (27,25 %)	Canfora (21,21 %)	Pineno (16,68 %)	Canfeno (9,89 %)	$\alpha$ terpineol (4,30 %)
<b>Rutaceae</b>						
Tangerina	<i>Citrus nobilis</i> var. <i>tangerinae</i>	Limoneno (97,02 %)	Mirceno (1,50 %)	Pineno (0,34 %)		
Laranja	<i>Citrus sinensis</i> var. <i>dulcis</i>	Limoneno (94,13 %)	Mirceno (3,50 %)	Pineno (0,68 %)	Caprialdeído (0,59 %)	Sabineno (0,47 %)

Estes compostos ativos pertencem a diferentes grupos químicos, como por exemplo, os hidrocarbonetos, os álcoois e ésteres, os aldeídos e as cetonas, os óxidos terpênicos e os fenóis e éteres fenólicos, sendo que os compostos terpênicos são os mais abundantes (Delaquis, Stanich, Girard, & Mazza, 2002). A Figura 5 mostra a estrutura química de alguns dos constituintes dos óleos essenciais.

#### *Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais*

De um modo geral, os OE apresentam um largo espectro antimicrobiano contra bactérias, leveduras e bolores o que tem sido comprovado por numerosos trabalhos publicados (Mith *et al.*, 2014; Mathlouthi *et al.*, 2015; Miladi *et al.*, 2016; Moghimi, Ghaderi, Rafati, Aliahmadi, & McClements, 2016; Radaelli *et al.*, 2016). A atividade antimicrobiana dos OE é atribuída a um pequeno número de terpenóides e compostos fenólicos como o timol, carvacrol, eugenol, que na sua forma pura apresentam elevada atividade antimicrobiana (Oussalah *et al.*, 2006). Os compostos que se encontram em quantidades vestigiais também contribuem para a atividade antimicrobiana do OE, provavelmente por criar sinergismo com os outros compostos (Burt, 2004). De notar, no entanto, que certos componentes dos alimentos, como proteínas e gorduras, são conhecidos por se ligarem e/ou solubilizarem compostos fenólicos, reduzindo a atividade antimicrobiana dos OE. Isto mostra que a atividade antimicrobiana de plantas condimentares pode ser menor em sistemas alimentares do que em meios de cultura (Barbosa *et al.*, 2009; Hyldgaard *et al.*, 2012).

Apesar de a atividade antimicrobiana dos OE ser bastante reconhecida e substanciada por muitos estudos, os mecanismos de ação antimicrobiana são ainda fracamente compreendidos (Hyldgaard *et al.*, 2012). É unânime que a maioria dos compostos aromáticos e fenólicos exerce os seus efeitos antimicrobianos diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações na sua estrutura e funções (Burt, 2004). Estudos recentes comprovam que a maioria das bactérias Gram positivas é mais suscetível do que as bactérias Gram negativas ao efeito inibitório dos OE (De Martino *et al.*, 2009; Hyldgaard *et al.*, 2012; Lucera, Costa, Conte, & Del Nobile, 2012; Mith *et al.*, 2014), provavelmente pela existência de uma membrana externa à parede celular nas bactérias Gram negativas que dificulta a difusão de compostos hidrofóbicos através de lipopolissacáridos (Burt, 2004). Segundo Hyldgaard *et al.* 2012, a maioria dos OE tem vários alvos na sua atividade antibacteriana, sendo por isso difícil de prever a suscetibilidade de um microrganismo a um determinado OE. São vários os termos utilizados para definir a atividade antimicrobiana dos OE. As suas definições encontram-se na Tabela 7. Os diferentes conceitos explicitados dificultam a comparação de resultados referidos em diferentes trabalhos.

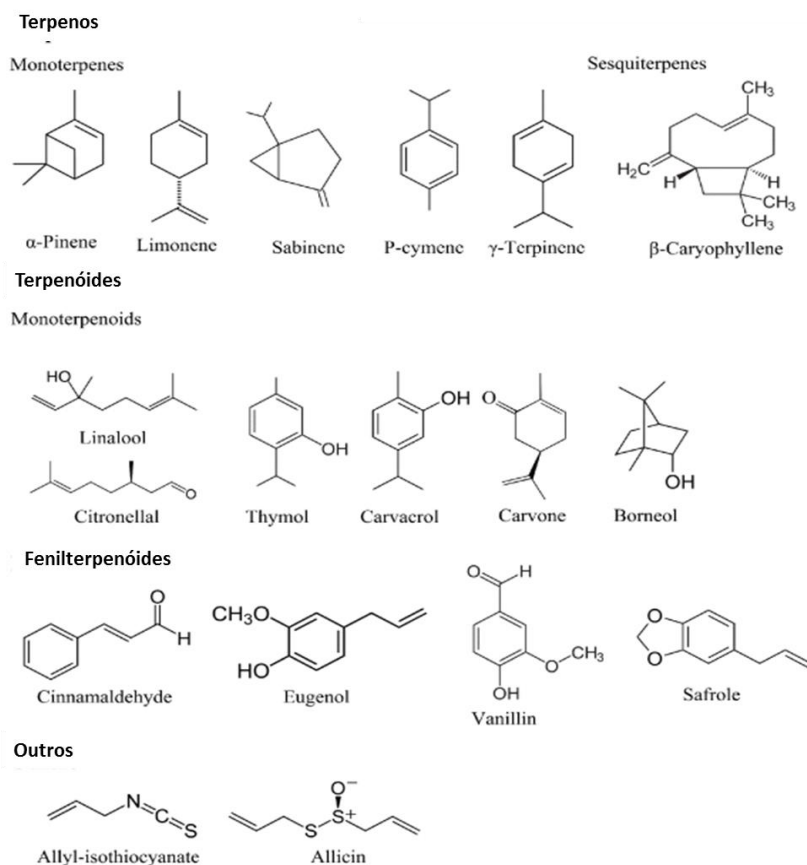


Figura 5. Estrutura química de alguns dos constituintes dos óleos essenciais  
(Adaptado de Hyldgaard *et al.*, 2012)

No contexto da segurança alimentar torna-se importante avaliar os níveis da concentração mínima bactericida (CMB) e não apenas os valores da concentração mínima inibitória (CMI), uma vez que é desejável a eliminação do inóculo e não apenas uma redução do seu crescimento. Contudo, a maioria dos estudos sobre a atividade antibacteriana dos OE contempla apenas os valores de CMI, o que poderá, eventualmente, limitar a avaliação real do seu potencial como bactericida. De salientar que acima de certas concentrações, os OE podem deixar de ser viáveis para uso alimentar por 1) se tornarem demasiado odoríferos e desagradáveis ao paladar (Frangos, Pyrgotou, Giatrakou, Ntzimani & Savvaidis, 2010) e 2) a maioria apresentar valores de toxicidade (Burt, 2004; Lima *et al.*, 2004).

Tabela 7. Termos utilizados para definir a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais  
(Fonte: Burt, 2004)

Termo utilizado	Definição para concentração do óleo essencial
<b>Concentração mínima inibitória (CMI)</b>	Concentração mínima para manter ou reduzir a viabilidade do inóculo (Carson <i>et al.</i> , 1995)
	Concentração mínima necessária para inibição do microrganismo em estudo após 48h de incubação (Canillac & Mourey, 2001)
	Concentração mínima que inibe visivelmente o crescimento do microrganismo em estudo (Delaquis <i>et al.</i> , 2002)
	Concentração mínima que reduz significativamente a viabilidade do inóculo (>90 %) (Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
<b>Concentração mínima bactericida (CMB)</b>	Concentração que elimina 99.9 % ou mais do inóculo inicial (Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
	Concentração mínima na qual não se observa crescimento após subcultura em meio líquido fresco (Onawunmi, 1989)
<b>Concentração bacteriostática</b>	Concentração mínima à qual a bactéria não cresce em meio líquido mas tem a capacidade de crescer quando transferida para placas de agar (Smith-Palmer <i>et al.</i> , 1998)
<b>Concentração bactericida</b>	Concentração mínima à qual a bactéria não cresce em meio líquido e não tem a capacidade de crescer quando transferida para placas com agar (Smith-Palmer <i>et al.</i> , 1998)

### Utilização dos óleos essenciais nos produtos alimentares

Inicialmente os OE eram utilizados para fins medicinais, tendo mais tarde desenvolvido o seu campo de atividade como ingredientes de substâncias aromatizantes (Pinto, Salgueiro, Cavaleiro, Palmeira, & Gonçalves 2007; Tajkarimi, Ibrahim & Cliver, 2010). São aplicados em diversos produtos entre os quais lacticínios, molhos, sobremesas, bebidas (Sahin *et al.*, 2004; Oussala *et al.*, 2006) sendo considerados GRAS (Lucera *et al.*, 2012). Embora a atividade antimicrobiana dos OE esteja bem estabelecida, a sua aplicação prática a nível alimentar é bastante limitada devido ao facto de conferirem odor forte e pouco agradável nas concentrações necessárias para apresentarem atividade antimicrobiana o que poderá resultar em alterações indesejadas no sabor (Tserennadmid *et al.*, 2011; Hyldgard *et al.*, 2012; Patrignani *et al.*, 2015). Tem-se revelado mais promissora a utilização de OE em embalagens alimentares, sendo que estes são encapsulados em polímeros comestíveis e biodegradáveis ou na própria embalagem que permite uma libertação ao longo do tempo para o alimento ou para o ambiente gasoso da embalagem (Sánchez-González, Vargas, González-Martínez, Chiralt, & Cháfer, 2011; Hyldgard *et al.*, 2012; Patrignani *et al.*, 2015; Guerreiro, Gago, Faleiro, Miguel & Antunes, 2015a;



Guerreiro, Gago, Faleiro, Miguel & Antunes, 2015b; Guerreiro, Gago, Faleiro, Miguel & Antunes, 2015c).

Os OE são utilizados na indústria alimentar como agentes naturais para prolongar o tempo de vida útil dos alimentos e podem ser agregados a outras tecnologias de barreira. São geralmente misturas de diversos componentes, alguns deles com efeitos antimicrobianos, tais como componentes de orégão, cravo, canela, alho, coentro, alecrim, salva (Tajkarimi *et al.*, 2010).

#### **1.4.2. O soro de queijo como desinfetante natural**

O soro, um sub produto da indústria resultante do fabrico de queijo é um outro produto que se tem revelado promissor como agente de desinfecção (Martin-Diana *et al.*, 2006; Panesar, Kennedy, Gandhi, & Bunko, 2007; Rico *et al.*, 2007). A elevada carência química de oxigénio (CQO) que apresenta, conduziu a que o soro tenha sido visto, até há poucos anos, como um problema de poluição ambiental significativo (Jelen, 2011). A premência de resolver esta questão e o reconhecimento das suas propriedades funcionais e nutricionais traduziu-se, nos últimos anos, em investigações conducentes a utilizações alternativas. Hoje em dia, o reaproveitamento do soro representa uma adição de valor, visto que permite a utilização das substâncias solúveis do leite nomeadamente proteínas, minerais e lactose. Outras aplicações que o soro pode ter são. a produção de requeijão, a incorporação em rações animais, a produção de galactose, glucose, ácidos orgânicos (e.g. ácido láctico e ácido acético), etanol ou como componente de fórmulas dietéticas, farmacêuticas ou cosméticas (Chollangi & Hossain, 2006; Guha, Banerjee & Bera, 2013; Das, Sarkar, Sarkar, Bhattacharjee & Bhattacharjee, 2016).

Os estudos que têm sido efetuados, abriram novos campos de investigação relacionados com o isolamento e a utilização de componentes específicos do soro de leite, que apresentaram diferentes e diversas bioatividades importantes para a saúde humana. Assim, para além de exercerem funções básicas de nutrição, as proteínas do soro, nomeadamente a  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) e  $\alpha$ -lactalbumina (ALA), constituem igualmente uma importante fonte de péptidos bioativos. Estes péptidos são libertados através da proteólise das proteínas do soro, quer esta seja durante o processamento alimentar ou durante o processo digestivo, sendo que alguns estudos sugerem que os péptidos bioativos podem apresentar propriedades antibacterianas (Rizello *et al.*, 2005; Almaas *et al.*, 2011). Por outro lado, o ácido láctico resultante do processo de fermentação também apresenta elevada atividade antibacteriana, sendo utilizado amplamente na indústria alimentar como conservante (Lin, *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2007). Assim, o uso dos produtos de fermentação do soro de leite, em técnicas de preservação da qualidade e da segurança alimentar, poderá ser de grande importância, mais especificamente na desinfecção de saladas minimamente processadas. Por outro lado a crescente

resistência dos microrganismos aos antibióticos torna premente a investigação de substâncias naturais que possam constituir alternativas e ajudem a minimizar este importante problema em saúde pública.

### *Processo de fabrico*

Embora existam diversos tipos de queijo, o processo de fabrico deste produto é relativamente semelhante para todos eles, envolvendo a transformação de uma matéria-prima líquida, num produto final sólido, através da precipitação das proteínas (Hutkins, 2006; Fox, 2011). A produção envolve geralmente um protocolo semelhante em que, desde a receção até à embalagem do produto final, as matérias-primas passam por uma série de etapas em que as alterações de algumas fases do processo permitem fornecer aos produtos diferentes características, que distinguem os vários tipos de queijo (Hutkins, 2006; Fox, 2011). Genericamente, leite, tratado ou não termicamente, é conduzido para cubas onde se dá a sua conversão em coalhada, através do processo de coagulação das principais proteínas do leite, as caseínas, formando assim um gel. Estas proteínas, que representam cerca de 80 % da fração proteica do leite, são, na grande maioria dos queijos, praticamente as únicas proteínas presentes (Hutkins, 2006). Dado que o queijo é, na sua maioria, constituído por caseínas e por gordura, o rendimento do processo de fabrico é muito baixo, cerca de 11 %, sendo necessário recorrer a cerca de 10 L de leite para obtenção de 1 kg de queijo (Prazeres, Carvalho & Rivas., 2012). Os restantes 89 % formam o soro de queijo.

### *Caracterização do soro de queijo*

Os 89 % que sobram da produção do queijo, *i.e.* o soro do queijo, retêm cerca de 55 % dos nutrientes do leite e pode ser definido como a parte aquosa do leite que resta, após a coagulação das caseínas. No caso de a coagulação ser realizada por ação do pH, o soro resultante denomina-se por soro “ácido”, e quando é realizada por ação de enzimas proteolíticas, o soro resultante é denominado como soro “doce” (Panesar *et al.*, 2007). A Tabela 8 mostra os principais componentes do soro.

Tabela 8. Composição típica do soro "doce" e do soro "ácido" (% m/v) (Adaptado de Jelen, 2011; Prazeres *et al.*, 2012)

	Soro “doce”	Soro “ácido”
Sólidos totais	6,3 – 7	6,3 – 7
Lactose	4,6 – 6,2	4,4 – 4,6
Proteínas	0,6 – 1	0,6 – 0,8
Ácido Láctico	0,2	0,64
Cálcio	0,04 – 0,06	0,12 – 0,16
Fósforo	0,1 – 0,3	0,2 – 0,45

*Caracterização proteica*

Face ao que foi exposto, verifica-se que o leite possui duas frações proteicas distintas, que se dissociam durante o fabrico do queijo, ficando a fração correspondente às caseínas retida sendo as restantes proteínas lixiviadas no soro. Estas proteínas são moléculas globulares, com uma estrutura secundária predominantemente constituída por hélices  $\alpha$ , e serão denominadas doravante como proteínas do soro (Madureira, Tavares, Gomes, Pintado & Malcata, 2010). Deste grupo proteico fazem parte, por ordem decrescente, a BLG, a ALA, as imunoglobulinas (Ig), a albumina do soro (SA), a lactoferrina (LF) e a lactoperoxidase (LP), bem como outros compostos proteicos menos abundantes, como o glicomacropéptido (Madureira, Pereira, Gomes, Pintado, & Malcata, 2007; Madureira *et al.*, 2010), que se encontram descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Principais proteínas do soro e suas características físico-químicas (Adaptado de Madureira *et al.*, 2007)

Proteína	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Peso molecular (kDa)	Resíduos de aminoácidos
$\beta$ - lactoglobulina	1,3	18	162
$\alpha$ – lactalbumina	1,2	14	123
Imunoglobulinas	0,7	25 (cadeia leve) + 50 – 70 (cadeia pesada)	Variável
Albumina do soro	0,4	66	582
Lactoferrina	0,1	80	690
Lactoperoxidase	0,03	70	612

*Aspetos económicos relevantes do soro do leite*

De acordo com Hutkins (2006), a indústria do queijo é a mais relevante ao nível do fabrico de produtos fermentados relativamente ao volume de leite consumido. As estatísticas publicadas pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2015a), indicam que a produção de queijo aumentou em cerca de 2,5 milhões de toneladas de 2005 até 2013, sendo os três principais produtores os EUA (4,9 milhões de toneladas), Alemanha (2,2 milhões de toneladas) e França (1,8 milhões de toneladas) (FAO, 2015a). Em 2013, dos 769 milhões de toneladas de leite produzidos, a nível mundial, cerca de 15 % foram utilizados para a produção dos 21 milhões de toneladas de queijo (FAO, 2015a e b). Em Portugal, no ano de 2013, houve uma quebra de produção de 3000 toneladas face ao ano anterior, como se pode observar na Figura 6 (FAO, 2015a). Tendo em conta que 1 kg de queijo dá origem a 9 L de soro, no ano de 2013 foram produzidas c.a. de 633 milhões de litros de soro.

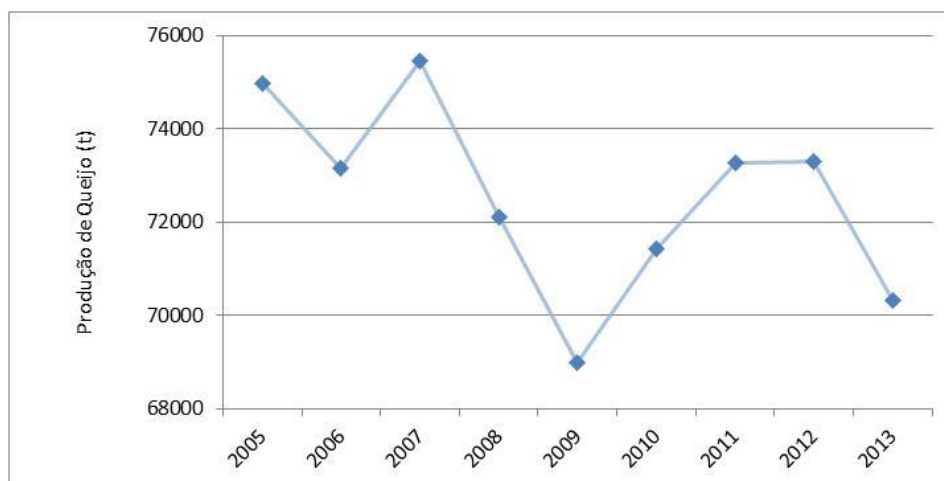


Figura 6. Evolução da produção de queijo em Portugal no período 2005-2013

(Fonte: FAO, 2015a)

A nível da Europa, como se pode observar na Figura 7, verificou-se uma produção de 144 milhões de litros de leite dos quais 36,2 % foram utilizados no fabrico de queijo, 48,3 % no fabrico de outros produtos e apenas 12,1 % foram usados para beber (EUROSTAT, 2016).

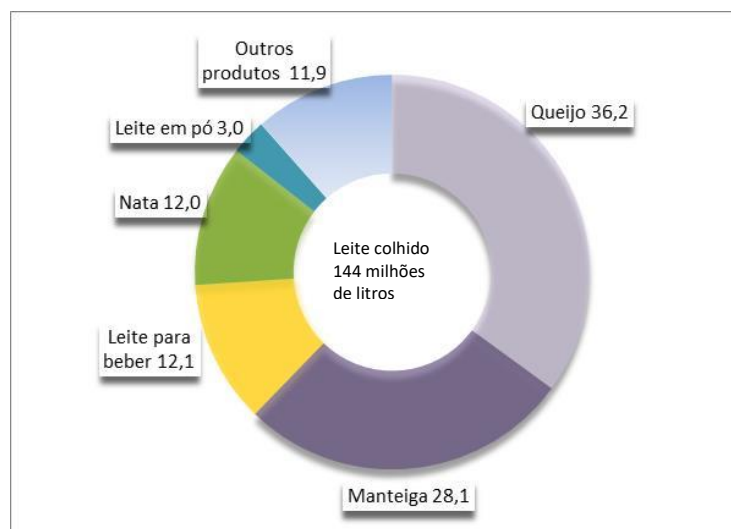


Figura 7. Utilização de leite inteiro UE, 2013 (Fonte EUROSTAT, 2016)

### *Um problema ambiental*

A indústria do fabrico de queijo gera uma quantidade significativa de soro, dado que aproximadamente 89 % do leite utilizado para o seu fabrico é transformado em soro. Em virtude da sua composição rica em matéria orgânica, nomeadamente lactose e proteínas, que conduzem a uma elevada CQO, associado ao facto de ser produzido em grandes quantidades, o soro de queijo representa um importante problema de poluição, sendo importante encontrar alternativas para a sua utilização,

minimizando o seu impacto ambiental (Prazeres *et al.*, 2012; Carvalho, Prazeres & Rivas, 2013; Murari, Moraes, Bueno & Del Bianchi, 2013). Relativamente aos parâmetros físico-químicos, este produto apresenta valores de carência biológica de oxigénio (CBO) entre os 27 e os 60 g.L<sup>-1</sup> e valores de CQO no intervalo entre os 50 e os 102 g.L<sup>-1</sup>, o que conduz a um elevado consumo de oxigénio nos efluentes recetores (Carvalho *et al.*, 2013).

#### *A fermentação como estratégia para aumentar o potencial antibacteriano do soro*

Historicamente o soro foi considerado um resíduo sem valor que era necessário eliminar sem custos acrescidos. Deste modo, a descarga direta em cursos de água, esgotos, ou no campo e a utilização como matéria-prima para a alimentação animal, foram as formas mais usuais de eliminação deste subproduto. Contudo, as preocupações ambientais que entretanto se manifestaram nas sociedades e que conduziram à publicação de legislação restritiva concomitantemente com os avanços científicos conduziram à valorização deste resíduo com indubitáveis vantagens para os agentes económicos e para a sociedade (Smithers, 2008; Brandelli, Daroit & Corrêa, 2015).

As aplicações do soro de leite na indústria alimentar são diversas, devido ao seu elevado valor nutritivo, como fonte de proteína. Uma vez que o soro de queijo possui teores de lactose e de proteínas elevados, a sua valorização biotecnológica, como substrato fermentativo, tem também vindo a ser explorada, nomeadamente para a produção de bioetanol, biogás e ácido láctico (Smithers, 2008; Comino, Riggio, & Rosso 2012; Hadiyanto, Ariyanti, Aini & Pinundi, 2014). Para além disso, algumas empresas utilizam o soro como meio de propagação de bactérias lácticas, utilizadas no processo de produção do queijo (Jelen, 2011). Contudo, a fermentação do soro possui também um elevado potencial para a indústria alimentar, na medida em que promove a remoção de proteínas responsáveis por reações alérgicas (BLG e ALA), e também da lactose. O efeito direto deste processamento é a produção de ácido láctico a partir da lactose, o que pode aumentar o tempo de prateleira do produto, graças à sua atividade antibacteriana. No caso das proteínas do soro, desde há muito tempo que vários estudos se têm vindo a focar no isolamento de sequências polipeptídicas específicas com atividade antibacteriana, que podem ser utilizadas, tanto na indústria alimentar, como em medicina (e.g. antibióticos e nutracêuticos) (Zacharof & Lovitt, 2012; Madureira *et al.*, 2013).

#### *A fermentação láctica e a produção de compostos antibacterianos*

A fermentação é o processo metabólico no qual os hidratos de carbono e outros compostos semelhantes, são parcialmente oxidados tendo como principal resultado a produção de ácidos orgânicos, mas também de álcool e dióxido de carbono (Jay, Lossener & Golden, 2005).

As bactérias do ácido láctico (BAL) são usadas há milhares de anos na fermentação dos alimentos a qual constitui uma das técnicas mais antigas de conservação, continuando a ser utilizada hoje em dia

para o fabrico de especialidades gastronómicas amplamente apreciadas (Adams & Moss, 2008). Neste sentido, muitas estirpes de BAL foram consideradas pela EFSA com *Qualified Presumption of Safety* (QPS) (Leuschner *et al.*, 2010; EFSA, 2014). Estas encontram-se em diversos nichos ecológicos, principalmente alimentos vegetais e animais fermentados ou não (Booyse & Dicks, 2002; Ackermann, 2002; Adnan & Tan, 2007; Hwanhlem *et al.*, 2011; Suhartatik, Cahyanto, Rahardjo, Miyashita & Rahayu, 2014) mas também no leite (Martin *et al.*, 2003) e no trato gastrointestinal humano (Rubio, Jofré, Martín, Aymerich & Garriga, 2014). Muitas espécies de BAL são consideradas probióticos, isto é, microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2006; Sanders, 2008; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012; Argyri *et al.*, 2013; García-Ruiz *et al.*, 2014).

As BAL caracterizam-se por serem bactérias com forma de bacilos ou cocos Gram positivas, catalase e oxidase negativas, não esporuladas, estritamente fermentativas, mas aerotolerantes, cujo principal produto do metabolismo dos açúcares é o ácido láctico (Bjorkroth & Koort, 2011; von Wright & Axelsson, 2012). Podem ser consideradas como microrganismos meso ou termófilos, com temperaturas ótimas (dependendo da espécie) entre os 30 e 42 °C, apresentando bastante tolerância a ambientes ácidos (Hutkins, 2006; von Wright & Axelsson, 2012). As BAL podem ser isoladas a partir de variados alimentos e têm sido propostas, com resultados promissores como culturas protetoras de *lamb's lettuce* e maçãs MP, visto que estas bactérias apresentam grande potencial como bio controlo de bactérias patogénicas (Trias, Bañeras, Badosa, & Montesinos, 2008; Siroli *et al.*, 2015).

As BAL, filogeneticamente, pertencem ao grupo das bactérias Gram positivas com composição de DNA inferior a 50 % mol de G + C e incluem-se no ramo *Clostridium* (Figura 8). São reconhecidos cerca de 20 géneros sendo considerados os principais, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Enterococcus* (O'Sullivan, Lee & Dominguez, 2011). O género *Lactobacillus*, o qual compreende mais de 125 espécies e subespécies, é de longe o maior (Panesar *et al.*, 2007) e muitas bactérias deste género desempenham um papel importante na indústria de lacticínios. De referir que alguns destes géneros incluem, para além de estirpes probióticas, espécies que são patogénicas. A espécie *Bifidobacterium*, embora seja um microrganismo probiótico, exibe mais de 50 % mol G + C, não se relacionando com as BAL mas sim com o filo *Actinobacteria* (Prescott, Harley & Klein, 2005; Björkroth & Koort, 2011; O'Sullivan *et al.*, 2011).

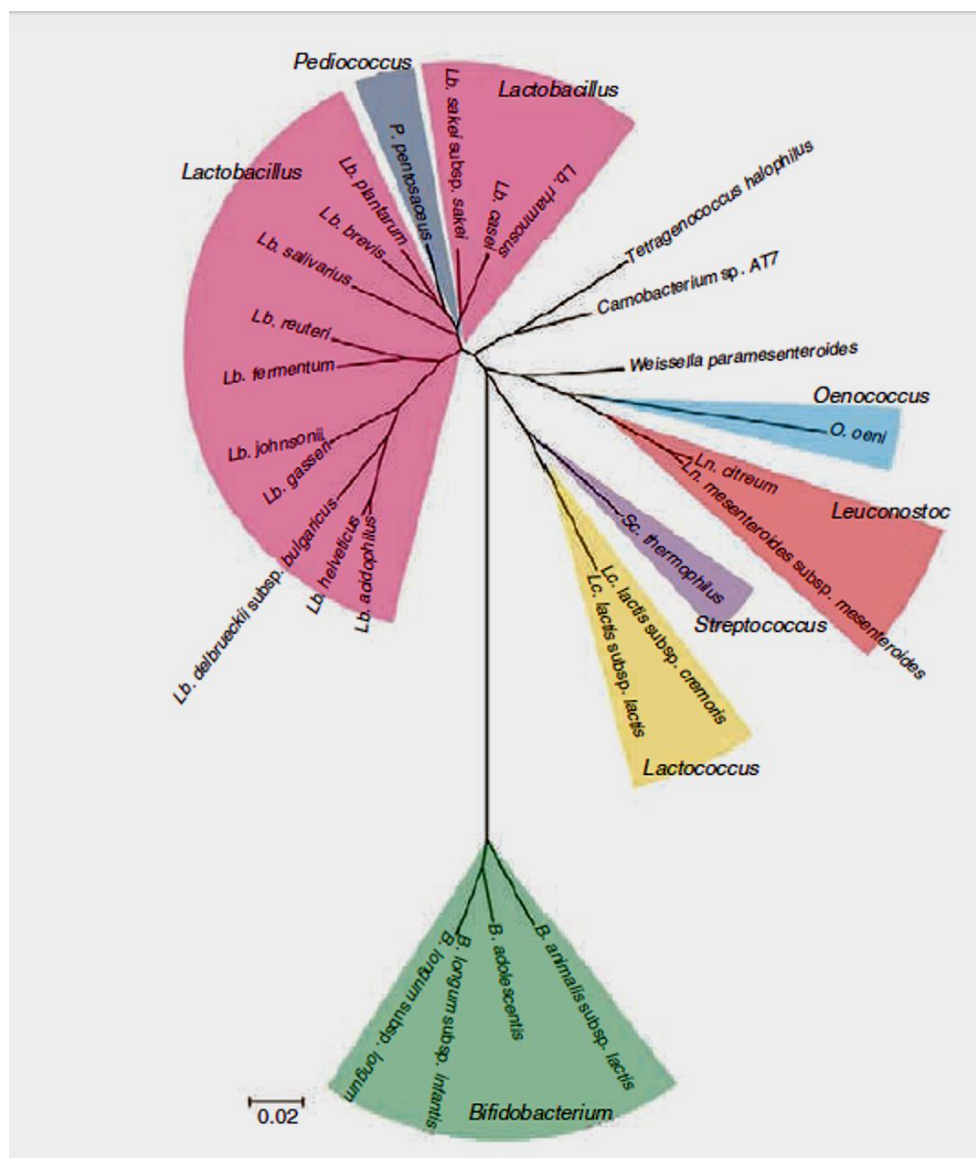


Figura 8. Árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA

(Fonte: O'Sullivan, *et al.*, 2011)

Este é o grupo de bactérias mais importante a nível industrial, nomeadamente ao nível das culturas *starter*, sendo principalmente utilizadas na fermentação de laticínios (Hutkins, 2006).

Assim, o ácido láctico é o principal produto da fermentação láctica, por parte deste grupo de bactérias, tendo um papel importante como agente antimicrobiano nos alimentos fermentados. As BAL são microrganismos considerados benéficos, uma vez que vários trabalhos apontam para o seu potencial probiótico (Monteagudo-Mera *et al.*, 2012; Argyri *et al.*, 2013; García-Ruiz *et al.*, 2014).

As principais bactérias lácticas compreendem:

Género *Lactobacillus*:

Trata-se do maior género de bactérias lácticas, compreendendo mais de uma centena de espécies, muitas delas com um papel de destaque na indústria dos laticínios, como *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ou *L. plantarum* (De Angelis & Gobbetti, 2011; Barrangou, Lahtinen, Ibrahim & Ouwehand, 2012). São bastonetes Gram positivos, microaerofílicos, que podem ser encontrados em diversos nichos ecológicos, de entre os quais o corpo humano (Barrangou *et al.*, 2012). Estas bactérias são utilizadas como culturas *starter* e probióticas, uma vez que produzem rapidamente uma grande quantidade de ácido láctico, levando ao decréscimo do pH; são reconhecidas como sendo detentoras de um estatuto GRAS; sintetizam bacteriocinas e exopolissacáridos; e contribuem para a aromatização de vários produtos, devido à produção de acetaldeído e diacetil (De Angelis & Gobbetti, 2011).

Género *Lactococcus*:

Este género, constituído por 7 espécies, compreende bactérias mesofílicas, com morfologia cocóide, que podem ocorrer quer individualizadas, quer em cadeias. A espécie mais utilizada industrialmente é *Lactococcus lactis*, sendo utilizadas as suas diferentes subespécies: *lactis*, *cremoris* e *lactis* biovar. *diacetylactis* (Mills & Ross, 2011). Estas subespécies são todas homofermentativas, diferindo apenas na tolerância a concentrações salinas e à capacidade de metabolizar a arginina (von Wright, 2012). As suas funções a nível industrial mais significativas são o consumo da lactose, com consequente produção de ácido láctico; a produção de compostos aromáticos, derivada da degradação das proteínas do leite; e a produção de bacteriocinas, com propriedades antimicrobianas nomeadamente lacticina, lactococcina, lactociclina e nisina (Mills & Ross, 2011).

Género *Streptococcus*:

Das várias espécies que compõem este género, a mais relevante a nível alimentar é *Streptococcus thermophilus*. A nível morfológico, estas bactérias apresentam-se sob a forma de cocos, dispondo-se em pares ou cadeias longas. A sua temperatura ótima de crescimento está entre os 40 e os 45 °C, sendo por isso considerada como uma bactéria termofílica (Harnett, Davey, Patrick, Caddick & Pearce, 2011).

Do ponto de vista industrial, esta espécie é utilizada para o fabrico de vários produtos, em conjunto com outras espécies de BAL. Um destes produtos é o iogurte, que se baseia na fermentação do leite por parte de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus*, por ação de uma interação mutualista entre estas duas bactérias. Neste processo, ambas as espécies se estimulam mutuamente, quer através da produção de metabolitos secundários, quer da alteração do meio, nomeadamente pelo decréscimo do



pH, sofrendo picos populacionais alternados (Siewverts, Bok, Hugenholtz & van Hylckama Vlieg, 2008; Siewverts *et al.*, 2010).

### Ácido láctico

As BAL, não possuem sistema respiratório pelo que, a forma de obterem energia é recorrendo à fermentação láctica. Basicamente podem seguir duas vias de fermentação, dependendo dos produtos finais que originam: a via homofermentativa, caso o ácido láctico seja o único produto final; ou a via heterofermentativa, quando ocorre a produção de outros compostos, para além do ácido láctico, nomeadamente o ácido acético, o etanol e o dióxido de carbono (von Wright & Axelsson, 2012). O ácido láctico é o metabolito principal resultante da fermentação láctica sendo conhecido pelo seu poder antimicrobiano, tanto em alimentos de origem vegetal, como de origem animal (Akbas & Ölmez, 2007; Carpenter Smith & Broadbent, 2011; Wang *et al.*, 2013; Wang, Chang, Yang & Cui, 2014; Wang, Chang, Yang & Cui, 2015). É reconhecido como GRAS, pela *Food and Drug Administration* (FDA) podendo ser adicionado aos géneros alimentícios como agente antimicrobiano, conservante, aromatizante e estabilizador de pH (21CFR184.1061).

Trata-se de um ácido monocarboxílico, com um pKa de 3,79, que pode ocorrer em duas formas isoméricas, a D(-) e a L(+) (Mani-López, García & López-Malo, 2012). O mecanismo de ação deste ácido como antimicrobiano relaciona-se com a baixa de pH que ocorre no meio e com o facto da forma não dissociada ser lipofílica e, por conseguinte, penetrar passivamente pela membrana celular, quando o pH do meio é ácido (Alakomi *et al.*, 2000; Mani-López *et al.*, 2012). No entanto, uma vez que o citosol possui valores de pH entre os 6 e os 7, a molécula do ácido dissocia-se no seu interior, interferindo com o funcionamento normal da célula. Esta interferência é devida ao desequilíbrio do pH intracelular, o que leva ao consumo de elevados níveis de ATP de modo a combater a acumulação de protões  $H_3O^+$ , bem como à acumulação de formas aniónicas, que são tóxicas para as células (Brul & Coote, 1999; Mani-López *et al.*, 2012). De acrescentar que o ácido láctico tem a capacidade de danificar as membranas celulares de patogénicos, nomeadamente *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., o que leva à libertação do conteúdo proteico e a alterações da estrutura intracelular (Wang *et al.*, 2015).

Em bactérias Gram negativas, a membrana externa, rica em lipopolissacáridos, funciona como uma importante barreira permeável a moléculas pequenas e hidrofóbicas, mas impermeável a macromoléculas (*e.g.* enzimas e bacteriocinas) (Bolla *et al.*, 2011). No entanto, uma vez que o ácido láctico é uma molécula de pequena dimensão e elevada solubilidade, apresenta a capacidade de penetrar esta barreira e atingir o espaço periplásmico, permeabilizando a membrana externa, devido à libertação dos lipopolissacáridos, facto que potencia os efeitos de outras moléculas antimicrobianas que não têm capacidade de penetração, tais como bacteriocinas e outros péptidos bioativos (Alakomi *et al.*, 2000).

*Os péptidos antibacterianos*

A maioria das BAL são auxotróficas e não têm a capacidade de sintetizar aminoácidos. Estão descritas como microrganismos fastidiosos visto que nutricionalmente necessitam entre seis a catorze aminoácidos essenciais e, por outro lado, estão muito adaptadas a desenvolverem-se no leite, que é um meio pobre em aminoácidos livres e péptidos de curta cadeia sendo essencial que hidrolisem as proteínas para lhes permitir o crescimento, o que explica a importância do sistema proteolítico que as BAL apresentam (Christensen, Dudley, Pederson & Steele, 1999; Lopez-Kleine & Monnet, 2011). Adicionalmente, é através deste metabolismo e todo o conjunto de reações que envolve o catabolismo deste grupo de moléculas, que as BAL conferem aos alimentos fermentados os sabores característicos que lhe são próprios (Savijoki, Ingmer & Varmanen, 2006). Um exemplo disto é a proteólise das caseínas, aquando da maturação de certos tipos de queijo, que leva a um desenvolvimento dos seus atributos organoléticos característicos, pois os seus aminoácidos são convertidos, pelas bactérias lácticas, em álcoois, aldeídos, ésteres, tióis e ácidos orgânicos (Smit, Smit & Engels, 2005).

O papel das proteínas como nutriente funcional é já conhecido, desde há muito tempo. A grande maioria, que se encontra naturalmente presente nos alimentos, desempenha a sua ação fisiológica, quer diretamente, quer após sofrer hidrólise enzimática (Korhonen & Pihlanto, 2006). Estas moléculas são uma fonte de péptidos bioativos – fragmentos de proteínas que, enquanto são parte de uma sequência proteica maior, não possuem qualquer atividade, mas que após libertação têm um efeito fisiológico benéfico na saúde dos consumidores (Espitia *et al.*, 2012). É importante referir que a comunidade científica se tem debruçado sobre este assunto nomeadamente nas áreas alimentar e nutracêutica, sendo que o número de publicações com este tema aumentou para o dobro, no período de 2000 a 2012 (Sánchez-Rivera, Martínez-Maqueda, Cruz-Huerta, Miralles & Recio, 2014).

Estes péptidos bioativos podem ser provenientes de fontes diversificadas no entanto a sua principal origem é sem dúvida as proteínas do leite. (Korhonen & Pihlanto, 2003; Hafeez *et al.*, 2014). Nos últimos anos não pára de aumentar o número de péptidos bioativos conhecidos, provenientes de produtos láteos, nomeadamente hidrolisados proteicos e produtos fermentados, e hoje em dia são perfeitamente conhecidas as suas atividades antimicrobianas, imunomodulatórias, anti-hipertensoras, antiolesterolémicas, antioxidantes, opióides e anticancerígenas (Tabela 10) (Choi, Sabikhi, Hassan & Anand, 2012). Algumas das atividades, a nível fisiológico (e.g. anti-hipertensores, antitrombóticos), devem-se ao facto de estas moléculas possuírem um mecanismo de inibição de enzimas proteolíticas (Smacchi & Gobetti, 2000).

Tabela 10. Atividade e origem dos péptidos bioativos do leite (Adaptado de Pellegrini *et al.*, 1999; Chatterton *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2012)

Atividade	Origem	Nomenclatura
Anti-hipertensora	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Casocininas
	$\alpha$ -lactalbumina	Lactocininas
	$\beta$ -lactoglobulina	
Antimicrobiana	Lactoferrina	Lactoferricina B
	$\alpha$ -Caseína	
	$\kappa$ -Caseína	
	$\alpha$ -lactalbumina	Capacina
	$\beta$ -lactoglobulina	
Antitrombótica	$\kappa$ -Caseína	Casoplatelinas
Imunomodulatória	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Imunopéptidos
	$\alpha$ -lactalbumina	
	$\beta$ -lactoglobulina	
Osteoprotetora	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Caseinofosfopéptidos
Opióide	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Casomorfina
	$\alpha$ -lactalbumina	$\alpha$ -lactorfinas
	$\beta$ -lactoglobulina	$\beta$ -lactorfinas
	Lactoferrina	
Anticancerígena	$\alpha$ -lactalbumina	
	Albumina do soro	
Antioxidante	Caseína	

Este tipo de péptidos podem ser produzidos com recurso a métodos diversos, sendo que os mais comuns são: (i) o recurso a proteínas digestivas (e.g. tripsina, pepsina), (ii) a atividade microbiana, durante a fermentação e (iii) a utilização de enzimas provenientes de microrganismos proteolíticos (Korhonen & Pihlanto, 2003).

Como visto acima, as bactérias lácticas têm a capacidade de digerir as proteínas do leite, de modo a obter moléculas mais pequenas, capazes de serem assimiladas. Contudo, durante o processo metabólico, podem existir alguns péptidos bioativos que não são aproveitados e que permanecem no meio (Hafeez *et al.*, 2014). Devido ao seu mecanismo inibitório de enzimas proteolíticas, alguns destes fragmentos podem ter um efeito repressor no sistema proteolítico das bactérias lácticas, nomeadamente ao nível das endopeptidases (Gobbetti, Stepaniak, Fox, Sorhaug & Tobiassen, 1995), inibindo a sua atividade.

Assim, desde há algum tempo que diversos estudos se têm vindo a focar no isolamento de sequências polipeptídicas específicas com atividade antibacteriana, que podem ser utilizadas, tanto na indústria

alimentar, como em medicina (*e.g.* antibióticos e nutracêuticos). Enquanto as proteínas na sua forma nativa, são aparentemente inativas (excetuando a lactoferrina e a lisozima), a sua hidrólise pode originar sequências polipeptídicas com efeito antimicrobiano (Clare & Swaisgood, 2000). Contudo, muitos dos estudos realizados neste âmbito, incidem maioritariamente sobre a atividade antimicrobiana dos produtos da hidrólise das caseínas (McCann *et al.*, 2006; Hayes, Ross, Fitzgerald, Hill & Stanton, 2006; Birkemo *et al.*, 2008). Em 1999, Pellegrini, Thomas, Bramaz, Hunziker & von Fellenberg isolaram e identificaram três fragmentos polipeptídicos da ALA, após digestão enzimática, com efeito bactericida. Recentemente, de modo a colmatar a falta de informação que existe em relação ao efeito antimicrobiano dos polipéptidos derivados de proteínas do soro, Théolier, Hammami, Labelle, Fliss & Jean (2013) desenvolveram um estudo onde foram testadas e encontradas atividades antibacterianas para sequências polipeptídicas provenientes da hidrólise de proteínas do soro, contudo, a sua utilização como agentes desinfetantes tem sido pouco estudada. Dentro deste contexto, os subprodutos das indústrias de laticínios (SIL), como o soro do leite, poderão apresentar uma alternativa de baixo custo para a produção de péptidos com ação antimicrobiana que poderão servir de agentes desinfetantes. A presença de péptidos antibacterianos no soro fermentado torna-se assim potencialmente interessante para aplicação em saladas.

### **1.5. As características de um bom desinfetante**

É de conhecimento geral que os HPM apresentam problemas de qualidade microbiológica que resultam na redução do período de vida útil dos mesmos e que podem originar surtos de doenças com origem alimentar. Presentemente, os métodos de desinfeção mais utilizados, além de serem nocivos para a saúde humana através de toxicidade, são pouco eficazes uma vez que o seu poder desinfetante não se mantém ativo durante muito tempo e as populações bacterianas sobreviventes multiplicam-se mais rapidamente do que as correspondentes populações em produtos não desinfetados (Nguyen-the & Carlin, 2000). Torna-se, portanto, cada vez mais evidente e urgente a necessidade de identificação de substâncias antibacterianas alternativas, de preferência de origem biológica, que sejam mais eficazes e inócuas para a saúde humana e para o ambiente. Sobretudo no contexto atual, em que os consumidores têm uma preferência maior pelos produtos naturais e que tenham um impacto positivo na saúde.

Neste contexto, a utilização de óleos essenciais ou do soro de queijo industrial apresenta várias vantagens económicas, ambientais e para a saúde. Assim, o uso destes produtos em técnicas de preservação da qualidade e da segurança alimentar poderá representar um grande potencial, na desinfeção de saladas MP. Contudo, não basta apenas que se identifique um bom agente

antibacteriano, é necessário que seja aplicável no contexto alimentar. Isto requer uma série de condições, que muitas vezes não são estudadas como um *follow-up* aos vários estudos científicos publicados. Um bom desinfetante alimentar para HPM deverá:

- 1) Ser eficaz nas doses indicadas;
- 2) Não ser tóxico nem corrosivo nem irritante;
- 3) Ser de fácil preparação e aplicação;
- 4) Ser económico.
- 5) Não afetar as características organoléticas do produto

## 2. Objetivos e Estrutura do Trabalho

Dentro do contexto apresentado, o objetivo deste trabalho foi Identificar novos agentes antibacterianos, biológicos e com benefícios para a saúde humana, que possam ser utilizados na desinfecção de saladas e na indústria alimentar (compostos antimicrobianos de origem natural – GRAS). Para este efeito, foram utilizados como material biológico:

- 1) óleos essenciais de várias espécies (*Origanum vulgare*, *Salvia sclarea*, *Salvia lavandulaefolia*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis*),
- 2) os produtos de fermentação do soro de leite, constituídos principalmente por ácido láctico e polipéptidos bioativos.

Deste modo, os objetivos específicos do trabalho foram:

- 1) Nos óleos essenciais:
  - Determinação das propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de maior interesse em Portugal devido ao seu reconhecido uso tradicional;
  - Determinação da suscetibilidade, a estes óleos, de uma gama de microrganismos representativos e de referência habitualmente encontrados em saladas;
  - Avaliação da sua aplicabilidade à desinfecção de saladas.

Os resultados deste trabalho constituem o capítulo 2 deste documento, onde se expõem as razões que levaram a abandonar esta via da utilização dos OEs na desinfecção de saladas. O trabalho foi objeto de um artigo submetido à revista *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY*, Manuscript ID: LAM-2017-0104.

2) Nos produtos de fermentação de soro de leite:

- Determinar as melhores condições de fermentação (bactérias lácticas, tempos de fermentação) e o melhor tipo de soro para obter valores mais elevados dos produtos de fermentação bioativos – ácido láctico e polipéptidos bioativos.

Este tema constitui o capítulo 3 - Caracterização do soro de queijo, determinação de condições de fermentação de forma económica e de baixo custo. Estes resultados não foram submetidos a publicação porque contêm resultados confidenciais.

- Comparar a eficiência do soro fermentado escolhido na redução de populações de microrganismos patogénicos inoculados em alface fresca, em comparação com o hipoclorito de sódio (desinfetante mais usual na desinfeção de saladas)

Este objetivo encontra-se explicitado no capítulo 4 - Efeito obtido na redução de bactérias patogénicas em alface cortada tratada com soro de queijo fermentado. Para este trabalho foram usadas as três bactérias mais frequentemente associadas a doença com origem alimentar, nomeadamente, *L. monocytogenes* 4b, *E. coli* O157:H7 e *S. Goldcoast*. Os resultados obtidos foram objeto de publicação na revista *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASES*: Volume 13, Number 8, 2016 DOI: 10.1089/fpd.2015.2079 e foram referenciados no jornal *The Packer*.

- Avaliar a capacidade antimicrobiana do soro fermentado em estirpes Gram positivas e Gram negativas, habitualmente presentes em saladas

Este tema encontra-se no capítulo 5 - Potencial do soro de queijo fermentado como desinfetante de vegetais MP. Foram testadas três soluções de soro fermentado para verificar a sua capacidade de diminuir/controlar a microbiota habitual neste tipo de produtos, em comparação com o cloro. Os resultados foram publicados na revista *FOOD CONTROL*: Volume 50 (2015) 477-481 doi:10.1016/j.foodcont.2014.09.032.

- Avaliar a bioatividade do soro fermentado escolhido como agente antimicrobiano na desinfeção de alfaces minimamente processadas, avaliando a preservação das suas características de sabor, aroma e aspeto.

Os resultados desta investigação encontram-se reunidos no capítulo 6 – O uso de soro fermentado como alternativa ao cloro e compreendem, para além das evidências na redução de microrganismos, o impacto do uso do soro em indicadores de qualidade como a textura e a cor, incluindo determinações de pH e de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> no interior de embalagens de alface tratada e conservada no frio ao longo de 10 dias. Foi ainda usada uma análise sensorial dos diferentes materiais. Estes resultados foram organizados e submetidos a publicação recentemente na revista *POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY*: Reference: POSTEC\_2016\_248.

- Isolar e caracterizar os polipéptidos obtidos durante a fermentação responsáveis pela atividade antibacteriana, utilizando espécies bacterianas modelo.

Esta matéria será tratada no capítulo 7- Isolamento e caracterização de Péptidos obtidos durante a fermentação de soro de queijo. Os resultados obtidos neste capítulo revelaram a existência de um novo péptido com elevada atividade antibacteriana, que será submetido ao registo de uma patente.

- Finalmente, nas Considerações Finais, são apontadas metodologias de desinfecção de saladas aplicadas à escala industrial, com os compostos bioativos selecionados, com o objetivo de aumentar o seu período de vida útil, preservando as suas características sensoriais.

## Referências Bibliográficas

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 121-29.
- Adams, M.R. & Moss, M.O. (2008). The Microbiology of food preservation. In *Food Microbiology* (pp.63-118). Cambridge, UK: RSC Publishing.
- Adnan, A. & Tan, I. (2007). Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98, 1380–1385.
- Akbas, M. & Ölmez, H. (2007). Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2609-2616.
- Alakomi, H., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kaler, K. & Helander, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2001–2005.
- Almaas, H., Eriksen, E., Sekse, C., Comi, I., Flengsrud, R., Holm... Vegarud, G. (2011). Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *The British Journal of Nutrition*, 106, 896–905.
- Allende, A., Tomás-Barberán, F.A. & Gil, M.I. (2006). Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 513–519.
- Argyri, A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J., Panagou, E. & Tassou, C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33, 282–291.
- Badosa, E., Trias, R., Parés, D., Pla, M. & Montesinos, E. (2008). Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 605–611.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Barbosa, L.N., Rall, V.L.M., Fernandes, A.A.H.F., Ushimaru, P.I., Probst, I.S. & Junior F.A. (2009). Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 725-728.



- Bari, M.L., Ukuku, D.O., Kawasaki, R., Inatsu, Y., Isshiki, K. & Kawamoto, S. (2005). Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *Journal of Food Protection*, 68, 1381-1387.
- Barrera, M.J., Blenkinsop, K. & Warriner, K. (2013). The effect of different processing parameters on the efficacy of commercial post-harvest washing of minimally processed spinach and shredded lettuce. *Food Control*, 25, 745-751.
- Barrangou, R., Lahtinen, S., Ibrahim, F. & Ouwehand, A. (2012). Genus *Lactobacillus*. In: S. Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen, A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (pp. 77-91). New York, USA: Taylor and Francis.
- Barth, M., Hankinson, T., Zhuang, H. & Breidt, F. (2009). Microbiological spoilage of fruit and vegetables. In W.H. Sperber & M.P. Doyle (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp.135-183). New York, EUA:Springer.
- Beuchat, L.R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4, 413–423.
- Beuchat, L.R. (1998). Surface Decontamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw. Food Safety Issues, World Health Organization, Geneva, WHO/FSF/FOS/98.2. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO\\_FSF\\_FOS\\_98.2.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO_FSF_FOS_98.2.pdf)
- Birmpa, A., Sfika, V. & Vantarakis, A. (2013). Ultraviolet light and Ultrasound as non-thermal treatments for the inactivation of microorganisms in fresh ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 96–102.
- Beuchat, L.R. (1996). Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. *Journal of Food Protection*, 59, 204-216.
- Beuchat, L.R., Adler, B.B. & Lang, M.M (2004). Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *listeria monocytogenes* on iceberg and romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *Journal of Food Protection*, 67, 1238-1242.
- Birkemo, G., O’Sullivan, O., Ross, R. & Hill, C. (2008). Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 233–240.
- Björkroth J. & Koort, J. (2011). Lactic acid bacteria: Taxonomy and Biodiversity. In J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (3: pp. 45-48). London, UK: Academic Press.

- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, & Watzl, B. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, 51, 637–663.
- Bolla, J.-M., Alibert-Franco, S., Handzlik, J., Chevalier, J., Mahamoud, ... Pagès, J.-M. (2011). Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 585, 1682–1690.
- Booyssena, C., Dicks, L., Meijering, I. & Ackermann, A. (2002). Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 63–73.
- Brandelli, A., Daroit, D.J. & Corrêa, A.P.F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149–161.
- Brandl, M.T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 367–392.
- Brandl, M.T. & Amundson, R. (2008). Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2298–2306.
- Brul, S. & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods - Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17.
- Buchanam, R.L. (2008). Emergence of Produce as a Vehicle for Foodborne Disease, apresentação oral em Roots of Foodborne Illness; Health Threats from Domestic and Imported Produce. Disponível em: <http://www.nyas.org/Publications/EBriefings/Detail.aspx?cid=d8f46e08-453f-463a-861d-f5df074b760b>
- Buckley, M., Cowan, C., & McCarthy, M. (2007). The convenience food market in Great Britain: Convenience food lifestyle (CFL) segments. *Appetite*, 49, 600 – 617.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Canillac, N. & Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 18, 261– 268.
- Caponigro, V., Ventura, M., Chiancone, I., Amato, L., Parente, E. & Piro, F. (2010). Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. *Food Microbiology*, 27, 1071–1077.

Carpenter, C.E., Smith, J.V. & Broadbent, J.R. (2011). Efficacy of washing meat surfaces with 2 % levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. *Meat Science*, 88, 256-260.

Cardador, M.J. & Gallego, M. (2012). Effect of the chlorinated washing of minimally processed vegetables on the generation of haloacetic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7326-7332.

Carvalho, F., Prazeres, A. & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 445-446, 385–396.

Carson, C.F., Cookson, B.D., Farrelly, H.D. & Riley, T.V. (1995). Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35, 421–424.

Castro-Rosas, J., Cerna-Cortes, J.F., Mendez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gomez-Aldapa, C.A., Estrada-Garcia, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 176–180.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2006). Ongoing multistate out-break of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach—United States, September 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 55, 1045–1046. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5538a4.htm>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2008). Outbreak of *Salmonella* Serotype Saintpaul Infections Associated with Multiple Raw Produce Items – United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57, 929-34.

Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm58e0507a1.htm>

CDC – Centers for Disease Control (2014). Estimates of Foodborne Illness in the United States. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/attribution/>

CDC – Centers for Disease Control (2016). List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigation. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>

Cenci, S.A. (2011). Processamento Mínimo de Frutas E Hortaliças. In S.A. Cenci (Ed.), *Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças: Tecnologia, Qualidade e Sistemas de Embalagem* (pp. 9-17). Brasil: Embrapa Agroindústria de Alimentos.

- Cerna-Cortes, J.F., Leon-Montes, N., Cortes-Cueto, A.L., Salas-Rangel, L.P., Helguera-Repetto, A.C., Lopez-Hernandez,...Gonzalez-y-Merchand, J.A. (2015). Microbiological quality of ready-to-eat vegetables collected in Mexico City: occurrence of aerobic-mesophilic bacteria, fecal coliforms, and potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 789508 9 pages. doi:10.1155/2015/789508
- Chatterton, D., Smithers, G., Roupas, P. & Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin—technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16, 1229–1240.
- Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A. & Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 1–12.
- Chollangi, A. & Hossain, M. (2006). Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 398-404.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I. & Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2, 228-243.
- Christensen, J., Dudley, E., Pederson, J. & Steele, J. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 217–246.
- Clare, D. & Swaisgood, H. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 1187–1195.
- Comino, E., Riggio, V., & Rosso, M. (2012). Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry and cheese whey. *Bioresource Technology*, 114, 46–53.
- Corbo, M.R., Speranza, B., Campaniello D., D'Amato, D. & Sinigaglia, M. (2010). Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies. In A. Mendéz-Villas (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied and Microbial Biotechnology* (pp. 1143-1154). Badajoz, Spain: Formatex.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. & Palmas, F. (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130-135.
- Costa, A.G., Deschamps, C., Côcco, L.C. & Scheer, A.P. (2014). Desenvolvimento vegetativo, rendimento e composição do óleo essencial do patchouli submetido a diferentes doses de nitrogênio no plantio e manutenção. *Bioscience Journal*, 30, 387-392.

Das, B., Sarkar, S., Sarkar, A., Bhattacharjee, S. & Bhattacharjee, C. (2016). Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. *Process Safety and Environmental Protection*, 101, 27-33.

Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101–109.

De Angelis, M. & Gobbetti, M. (2011). *Lactobacillus* spp.: general characteristics In J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 3:78-90). London, UK: Academic Press.

De Martino, L., De Feo, V., Formisano, C., Mignola, E. & Senatore, F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L.ssp. *hirtum* (link) letswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*, 14, 2735-2746.

EFSA – European Food Safety Authority European. (2011). Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *EFSA Journal*, 9:2274 [50 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2274

EFSA – European Food Safety Authority, Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2013). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA Journal*, 2013, 11, 3025. [138 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2013.3025

EFSA (2014) European Food Safety Authority. Qualified presumption of safety (QPS). Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qps.htm>

EFSA / ECDC (2015). European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015, 13, 4329. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329

Erickson, M.C. (2012). Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 283-310.

Espinoza-Medina, I.E., Rodriguez-Leyva, F.J., Vargas-Arispuro, I., Isla-Osuna, M.A., Acedo-Felix, E. & Martinez-Tellez, M.A. (2006). PCR Identification of *Salmonella*: potencial contamination sources from production and postharvest handling of cantaloupes. *Journal of Food Protection*, 69, 1422-25.

Espitia, P., Soares, N., Coimbra, J., Andrade, N., Cruz, R. & Medeiros, E. (2012). Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 187–204.

EUROSTAT – Autoridade Estatística da União Europeia (2016). Produtos Agrícolas. *EUROSTAT Statistics Explained*. Disponível em: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agricultural\\_products/pt](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agricultural_products/pt)

Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venâncio, F., Tavares, R., Brito, J.C., ... Pedro, L.G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35-40.

FAO/WHO – Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization - Food and Agricultural Organization of the United Nations (2006). Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO and Food Nutrition Paper 85, Rome, Italy: FAO/WHO. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>

FAO/WHO – Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization (2008). Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. *Microbiological Risk Assessment Series*, No. 14. Rome, Italy: WHO, FAO. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0452e/i0452e00.pdf>

FAO – Food and Agricultural Organization of the United Nations (2015a). FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QP/E>

FAO – Food and Agricultural Organization of the United Nations (2015b). Dairy Production and Products: Milk Production. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.V3zgRDVu3fZ>

FDA - Food and Drug Administration (1998). Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM169112.pdf>

Faour-Klingbeil, D., Murtada, M., Kuri, V. & Todd, E.C.D. (2016). Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East, *Food Control*, 62, 125-133.

Fonseca, J.M. & Ravishankar, S. (2007). Safer salads. contaminated fruits and vegetables are more common than ever. why? and what can consumers do to protect themselves?”, *American Scientist*, 95, 494-501.

Fox, P.F. (2011). Cheese: Overview. In J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1:534-543). London, UK: Academic Press.

Francis, G.A., Gallone, A., Nychas, G.J., Sofos, J.N., Colelli, G., Amodio, M.L. & Spano, G. (2012). Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 595-610

Francis, G.A., Thomas, C. & O' Breirne, D. (1999). The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 1-22.

Frangos, F., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. & Savvaidis, I.N. (2010). Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. *Food Microbiology*, 27, 115-121.

Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., Heiden, M. ... Krause, G. (2011). Epidemic profile of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The New England Journal of Medicine*, 365, 1771-1780.

Fröder, H., Martins, C.G., Souza, K.L.O., Landgraf, M., Franco, B.D.G.M. & Destro, M.T. (2007). Minimally processed vegetables salads: microbial quality evaluation. *Journal of Food Protection*, 70, 1277-1280.

Gachkar, L., Yadegari, D., Bagher Rezaei, Masood Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102, 898–904.

García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 44, 220–5

Gault, G., Weill, F.X., Mariani-Kurkdjian, P., Jourdan-da Silva, N., King, L., Aldabe, B., ... Rolland, P. (2011). Outbreak of hemolytic uremic syndrome and bloody diarrhea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011. *Eurosurveillance*, 16, pii=19905. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19905>

Gelting, R.J., Baloch, M.A., Zarate-Bermudez, M.A. & Selman, C. (2011). Irrigation water issues potentially related to the 2006 multistate *E. coli* O157:H7 outbreak associated with spinach. *Agricultural Water Management*, 98, 1395–1402.

Gil, M.I., Selma, M.V., López-Gálvez, F. & Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 37-45.

Gobbetti, M., Stepaniak, L., Fox, P.F., Sorhaug, T. & Tobiassen, R. (1995). Inhibition of endo- and amino-peptidase activities in cytoplasmic fractions of *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Propionibacterium* by peptides from different cheeses. *Milchwissenschaft*, 50, 565–570.

Gómez-López, V.M., Marín, A., Allende, A., Beuchat, L.R. & Gil, M.I. (2013). Postharvest handling conditions affect internalization of *Salmonella* in baby spinach during washing. *Journal of Food Protection*, 76, 1145–1151.

Gómez-López, V., Ragert, P., Debevere, J. & Dvlieghere, F., (2008). Descontamination methods to prolong the shelf-life of minimally processed vegetables, State-of-the-art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 487-495.

Gómez-López, V.M., Ragaert, P., Ryckeboer, J., Jeyachandran, V., Debevere, J. & Devlieghere, F. (2007). Shelf-life of minimally processed cabbage treated with neutral electrolysed oxidising water and stored under equilibrium modified atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 91-98.

Goodburn, C. & Wallace, C. (2013). The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control*, 32, 418-427.

Gopal, A., Coventry, J., Wan, J., Roginski, H. & Ajlouni, S. (2010). Alternative disinfection techniques to extend the shelf life of minimally processed iceberg lettuce. *Food Microbiology*, 27, 210-219.

Gossner C.M., de Jong B., Hoebe C.J. & Coulombier D. (2015). Event-based surveillance of food- and waterborne diseases in Europe: Urgent inquiries (outbreak alerts) during 2008 to 2013. *EuroSurveillance*, 20, pii=21166.

Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21166>

Guan, T.T.Y., Gregory, B. & Richard A.H. (2005). Survival of pathogenic bacteria in pesticides solutions and on treated tomato. *Journal of Food Protection*, 68, 296-304.

Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C. & Antunes, M.D.C. (2015a). Raspberry fresh fruit quality as affected by pectin and alginate-based edible coatings enriched with essential oils. *Scientia Horticulturae*, 194, 138-146.

Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C. & Antunes, M.D.C. (2015b). The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 226-233.



Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C. & Antunes, M.D.C. (2015c). The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 51-60.

Guha, A., Banerjee, S. & Bera, D. (2013). Production of lactic acid from sweet meat industry waste by *Lactobacillus delbruki*. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2, 630-634.

Guo, X., Iersel, M.W., Chen, J., Brackett, R.E. & Beuchat, L.R. (2002). Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3639-3643.

Gyawalia, R. & Ibrahim, S.A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.

Hadiyanto, H., Ariyanti, D., Aini, A.P. & Pinundi, D.S. (2014). Optimization of ethanol production from whey through fed-batch fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Procedia*, 47 108 – 112.

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L. & Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Reserch International*, 63, 71–80.

Hanning, I.B., Johnson, M.G. & Ricke, S.C. (2008). Precut Prepackaged Lettuce: A Risk fo Listeriosis? *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 731-46.

Harnett, J., Davey, G., Patrick, A., Caddick, C. & Pearce, L. (2011). *Streptococcus thermophiles*. In J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 3: 143–148). London, UK: Academic Press.

Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H. & Busta, F.F. (2003). Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 78-141.

Hayek, S.A., Gyawali, R. & Ibrahim, S.A. (2013). Antimicrobial natural products. In A. Mendéz-Villas (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (pp. 910-921). Badajoz, Spain: Formatex.

Hayes, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G., Hill, C. & Stanton, C. (2006). Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 2260–2264.

Heard, G. (2002). Microbiology of Fresh-Cut Produce. In O. Lamikanra (Ed.), *Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market* (pp. 187-248). Boca Raton, EUA: CRC Press.

Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., ... Slutsker, L. (1999). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine*, 159, 1758-64.

Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. & Maneerat, S. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*, 22, 401–407.

Hyldgaard, M., Mygind, T. & Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012

Holden, N., Pritchard, L. & Toth, I. (2009). Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (4), 689-703.

Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, A., Crookes, K.M. & Avery, S.M. (2004). effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5111-5118.

Hutkins, R. (2006). Cheese. In: R. Hutkins (Ed.), *Microbiology and Technology of Fermented Foods* (pp. 145–206). Oxford,UK: Blackwell Publishing.

Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. & Maneerat, S. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*, 22, 401–407.

Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. & Jiang, X. (2004a). Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection*, 67, 1365-70.

Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P. & Jiang, X. (2004b). Fate of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2497-502.

Janssen, M., Geeraerd, A.H., Cappuyns, A., Garcia-Gonzalez, L., Schockaert, G., Van Houteghem, N., Van Impe J.F. (2007). Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *Listeria innocua* Inactivation: development of a predictive model and assessment of experimental variability. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1601-1611.

- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). Milk, fermentation, and fermented and no fermented dairy products. *Modern Food Microbiology* (pp. 149-173). New York, EUA: Springer.
- Jeddi, M.Z., Yunesian, M., Gorji, M.E., Noori, N., Pourmand, M.R., Reza, G., & Khaniki, J. (2014). Microbial evaluation of fresh, minimally-processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 32, 391–399.
- Jelen, P. (2011). Whey processing: utilization and products. In J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 4:731-737). London, UK: Academic Press.
- Juneja, V.K. (2003). Sous-vide processed foods: safety hazards and control of microbial risks. In J.S. Novak, G.M. Sapers & V.K. Juneja (Eds.), *Microbial Safety of Minimally Processed Foods* (pp. 97-124). Boca Raton, EUA: CRC Press.
- Jung, Y., Jang, H. & Matthews, K.R. (2014). Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology*, 7, 517-527.
- Karagözlü, N., Ergönül, B & Özcan, C. (2011). Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. *Food Control*, 22, 1851-1855.
- Kennedy, S.P. & Busta, F.F. (2007). Biosecurity: Food Protection and Defense. In M.P. Doyle & L.R. Beuchat (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 87-102). Washington, EUA: ASM Press.
- Khiyami, M., AL-Faris, N., Busaeed, B. & Sher, H. (2011). Food borne pathogen contamination in minimally processed vegetable salads in Riyadh, Saudi Arabia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 444-451.
- King, L.A., Nogareda, F., Weill, F. X., Mariani-Kurkdjian, P., Loukiadis, E., Gault, G., ... de Valk, H. (2012). Outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. *Clinical and Infectious Diseases*, 54, 1588–1594.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297–1308.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.
- Leuschnera, R.G.K., Robinsonb, T.P., Hugasa, M., Cocconcellic, P.S., Richard-Forgetd, F., Kleine, G., .... von Wright, A. (2010). Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for

biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology*, 21, 425-435.

Li, H., Mehrdad, T. & Osburn, B.I. (2008). Impact of vacuum cooling on *Escherichia coli* O157:H7 infiltration into lettuce tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3138-42.

Lima C.F., Carvalho, F., Fernandes, E., Bastos, M.L., Santos-Gomes, P.C., Fernandes-Ferreira M. & Pereira-Wilson, C. (2004). Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 18, 457–465.

Lin, C.M., Moon, S.S., Doyle, M.P., McWatters, K.H., (2002). Inactivation of *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. *Journal of Food Protection*, 65, 1215–1220.

Lopez-Kleine, L. & Monnet, V. (2011). Proteolytic Systems. In J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 3:45-55). London, UK: Academic Press.

Lorenzetti, E.R., Monteiro, F.P., Souza, P.E., Souza, R.J., Scalice, H.K., Diogo, R. & Pires, M.S.O. (2011). Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 13, especial, 619-627.

Lubbe, A. & Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products* 2011, 34, 785-801.

Lubbe, A., Kashif A., Hae Choi, Y & Verpoorte, R. (2013). NMR-based metabolomics analysis. NMR-based metabolomics analysis. In M. Lämmerhofer & W. Weckwerth (Eds.), *Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic* (pp. 93-114). Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH.

Lucera, A., Costa, C., Conte, A. & Del Nobile, M.A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3, 287. doi:10.3389/fmicb.2012.00287

Lynch, M.F., Tauxe, R.V. & Hedberg, C.W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, 137, 307–315.

Madureira, A., Pereira, C., Gomes, A., Pintado, M. & Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*. 40, 1197–1210.

Madureira, A., Tavares, T., Gomes, A., Pintado, M. & Malcata F. (2010). Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 93, 437–455.

- Madureira, A.R., Soares, J.C., Amorim, M., Tavares, T., Gomes, A.M. Pintado, M.M, & Malcata, F.X. (2013). Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1458–1465.
- Maistro, L.C., Miya, N.T.N., Sant’Ana, A.S. & Pereira, J.L. (2012). Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP e Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. *Food Control*, 28, 258-264.
- Mani-López, E., García, H. & López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45, 713–721.
- Martín, R., Susana, L., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M., Xaus, J., Fernández, L. & Rodríguez, J. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, 143, 754–758.
- Martin-Diana, A., Rico, D., Frias, J. & Mulcahy, J. (2006). Whey permeate as a bio-preservative for shelf life maintenance. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 112 – 123.
- Martinez-Sanchez, A., Allende, A., Bennett, R.N., Ferreres, F. & Gil, M.I. (2006). Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biology and Technology*, 42, 86-97.
- Mathlouthi, N., Bouzaïenne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M. & Bergaoui, R. (2015). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *Journal of Animal Science*, 90, 813-823.
- McCann, K., Shiell, B., Michalski, W., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. & Coventry, M. (2006). Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine  $\alpha$ S1-casein. *International Dairy Journal*, 16, 316–323.
- Miladi, H., Mili, D., Slama, R.B., Zouari, S., Ammar, E. & Bakhrouf, A. (2016). Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis*, 93, 22-31.
- Millner, P.D. (2014). Manure management. In K.R. Matthews, G.M. Sapers & C.P. Gerba (Eds), *The Produce Contamination Problem Causes and Solutions* (pp. 85-106). Waltham, USA: Academic Press.
- Mills, S. & Ross, R., (2011). *Lactococcus lactis*. In J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 3:132-137). London, UK: Academic Press.

- Minter, A.M. & Foley, D.M. (2006). Electron beam and gamma irradiation effectively reduce listeria monocytogenes populations on chopped romaine lettuce. *Journal of Food Protection*, 69, 570-74.
- Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube1, G. & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2, 403-416.
- Moghim, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A. & McClements, D.J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, 194, 410–415.
- Moldão, M. & Empis, J. (2000). Elaboração de Produtos Minimamente Processados. In *Produtos Hortofrutícolas Frescos ou Minimamente Processados - Processamentos Mínimos* (pp. 35-54), Porto, Portugal: Sociedade Portuguesa de Inovação.
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. & Ferrero, M. (2012). *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4, 531–541.
- Murari, C. S., Moraes, D.C., Bueno, G.F. & Del Bianchi, V.L. (2013). Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces Marxianus* 229. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, 68, 42-50.
- Nguyen-the, C. & Carlin, F. (2000). Fresh and processed vegetables. In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker & G.W. Gould, (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 622-84). Gathersburg, USA: Aspen Publication.
- Odonkor, S.T., & Ampofo, J.K. (2013). *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*, 4, 5-11.
- Olaimat, A.N. & Holley, R.A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*, 32, 1-19.
- Ölmez, H. (2010). Effect of different sanitizing methods and incubation time and temperature on inactivation of *Escherichia coli* on lettuce. *Journal of Food Safety*, 30, 288-299.
- Ölmez, H. & Akbas, M.Y. (2009). Optimization of ozone treatment of fresh-cut green leaf lettuce. *Journal of Food Engineering*, 90, 487-94.

Ölmez, H. & Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-- Food Science and Technology*, 42, 686-693.

Onawunmi, G.O. (1989). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 9, 105– 108.

O’Sullivan, D.J., Lee, J.-H. & Dominguez, W. (2011). Genomics, genetic engineering. In J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 3:67-77). London, UK: Academic Press.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73, 236–244.

van Overbeek, L.S., Franz, E., Semenov, A.V., de Vos, O.J. & van Bruggen, A.H.C. (2010). The effect of the native bacterial community structure on the predictability of *E. coli* O157:H7 survival in manure-amended soil. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 425-430.

Painter, J.A., Hoekstra, R.M., Ayers, T., Tauxe, R.V., Braden, C.R., Angulo, F.J. & Griffin, P.M. (2013). Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 407-415.

Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D. & Bunko, K., (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105, 1–14.

Patrignani, F., Siroli, L., Serrazanetti, D.I., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2015). Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 311-319.

Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P. & von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426, 439–448.

Pinto, E., Salgueiro, L.R., Cavaleiro C., Palmeira, A. & Gonçalves, M.J. (2007). *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 26, 135–141.

Pirie, D.G., & Clayson, D.H.F. (1964). Some causes of unreliability of essential oils as microbial inhibitor in foods. *Proceeding of International symposium of food microbiol* (4th), 4th, Goteberg, 145-150, Goteborg, Sweden.

Poubol, J. & Izumi, H. (2005). Shelf life and microbial quality of fresh-cut mango cubes stored in high CO<sub>2</sub> atmospheres. *Journal of Food Science*, 70, M69-M74.

Prazeres, A., Carvalho, F. & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: a review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68.

Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005). Bacteria: The Low G + C Gram Positives. In *Microbiology* (pp.503-520). New York, USA: McGraw Hill.

Radaelli, M., Silva, P., Weidlich, L., Hoehne, L., Flach, A., Costa, L.A.M.A. & Ethur, E.M. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 424-430.

Ragaert, P., Devlieghere, F., Debevere, J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 185–194.

Ragaert, P., Verbeke, W., Devlieghere, F. & Debevere, J. (2004). Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Quality and Preference*, 15, 259 – 270.

Ramos, B., Miller, F.A., Brandão, T.R.S., Teixeira, P. & Silva, C.L.M. (2013). Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 1-15.

Raymundo, G.P. (2009). Hábitos Alimentares nos Tempos Modernos. *Com a palavra a nutricionista*. Disponível em:  
[http://www.aprendebrasil.com.br/falecom/nutricionista\\_bd.asp?codtexto=388](http://www.aprendebrasil.com.br/falecom/nutricionista_bd.asp?codtexto=388).

Regulamento (CE) Nº 2073 (2005) de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L338-1, Bruxelas.

Rico, D., Martín-Diana, A., Barat, J. & Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 373-386.

Rico, D., Martín-Diana, A.B., Heneham, G.T.M., Frias, J.M. & Barry-Ryan, C. (2006). Effect of ozone and calcium lactate treatments on browning and textured properties of fresh cut lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2179-2188.

Rizello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., Bari M.D. & Zambonin, P.G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88, 2348-2360.



- Rodgers, S.T., Cash, J.N., Siddiq, M. & Ryser, E.T. (2004). A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *Journal of Food Protection*, 67, 721-31.
- Rojas-Graü, M.A., Garner E. & Martin-Belloso, O. (2010). The fresh-cut fruit and vegetables industry. current situations and market trends. In O. Martin-Belloso & R. Soliva-Fortuny (Eds.), *Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing*, (pp. 1-12). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Rožman, T. & Jeršek, B. (2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 93, 51 – 58.
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T. & Garriga, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology*, 38, 303–311.
- Ruiz-Cruz, S. & Arvizu-Medrano, S. (2010). Quality loss of fruits and vegetables induced by microbial growth. In: L.A. Rosa, E. Alvarez-Parrilla & G.A. Gonzalez-Aguilar (Eds.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability* (pp. 341-355). Ames, USA: Blakwell Publishing.
- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G. & Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15, 549–557.
- Sagong, H., Lee, S., Chang, P., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y. & Dong-Hyun Kang (2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 287-292.
- Samadi, N., Abadian, N., Bakhtiari, D., Fazeli, M.R. & Jamalifar, H. (2009). Efficacy of detergents and fresh produce disinfectants against microorganisms associated with mixed raw vegetables. *Journal of Food Protection*, 72, 1486-1490.
- Sanders, M. (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46, S58–S61.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3, 1–16.
- Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B. & Recio, I. (2014). Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Research International*, 63, 170–181.

- Santos, J.S. & Oliveira, M.B.P.P. (2012). Alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15, 1-14.
- Santos, M.I., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M.R., Nogueira, P.J., Pedroso, L. & Ferreira, M.A.S.SA. (2012). Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control*, 23, 275-281.
- Savijoki, K., Ingmer, H. & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406.
- Sela, S., Nestel, D., Pinto, R., Nemny-Lavy, E. & Bar-Joseph, M. (2005). Mediterranean fruit fly as a potential vector of bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4052–4056.
- Siddiqui, M.W., Chakraborty, I., Ayala-Zavala, J.F. & Dhua, R.S. (2011). Advances in minimal processing of fruits and vegetables: a review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 70, 823-834.
- Sieuwert, S., de Bok, F., Hugenholtz, J. & van Hylckama Vlieg, J. (2008). Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Applied Environmental Microbiology*, 74, 4997–5007.
- Sieuwert, S., Molenaar, D., van Hijum, S., Beerthuyzen, M., Stevens, M., Janssen, P., ... van Hylckama Vlieg, J. (2010). Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 7775-7784.
- Silva, S.R.P., Verdin, S.E.F.V., Pereira, D.C., Schatkoski, A.M., Rott, M.B. & Corção, G. (2007). Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 594-598.
- Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K. & Strohine, R.L. (2002). Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *Food Microbiology*, 19, 183-193.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. & Tabanelli, G. (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiology*, 47, 74-84.
- Smacchi, E. & Gobetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17, 129–141.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, 26, 118–122.

Smit, G., Smit, B. & Engels, W. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591–610.

Smithers, G. (2008). Whey and whey proteins—from “gutter-to-gold”. *International Dairy Journal*, 18, 695–704.

Söderström A, Lindberg A & Andersson, Y. (2005). EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce. *Euro Surveillance*, 10, pii=2794. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2794>

Solomon, E.B., Potenski, C.J. & Matthews, K.R. (2002). effect of irrigation method on transmission to and persistence of *escherichia coli* o157:h7 on lettuce. *Journal of Food Protection*, 65, 673-676.

Souza, L.I., Stamford, T.L.M, Lima, E.O. & Trajano, V.N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18, 409-413.

Suhartatik, N., Cahyanto, M.N., Rahardjo, S., Miyashita, M. & Rahayu, E.S. (2014). Isolation and identification of lactic acid bacteria producing  $\beta$  glucosidase from Indonesian fermented foods. *International Food Research Journal*, 21, 973-978.

Szabo, E.A., Scurrah, K.J. & Burrows, J.M. (2000). Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. *Letters in. Applied Microbiology*, 30, 456-60.

Taban, B.M. & Halkman, A.K. (2001). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17, 286-287.

Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., & Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199–1218.

Tauxe, R. (2008). Emerging Foodborne Infections: The Plant Story, apresentação oral em *Roots of Foodborne Illness; Health Threats from Domestic and Imported Produce*, Disponível em: <http://www.nyas.org/Publications/EBriefings/Detail.aspx?cid=d8f46e08-453f-463a-861d-f5df074b760b>

Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J. & Wachsmuth K. (1997). Microbiological hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the national advisory committee on microbiological criteria for foods. *Journal of Food Protection*, 60, 1400-1408.

Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I. & Jean, J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5, 706–714.

Tian, J., Ban, X., Zeng, H., Huang, B., He, J. & Wang, Y. (2011). In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control*, 22, 1992-1999.

Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E. & Montesinos, E. (2008). Bioprotection of golden delicious apples and iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 50-60.

Tserennadmid, R., Takó M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvolgyi, C., Almássy, K. & Krisch, J. (2011). Anti-yeast activities of some essential oils in growth medium fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 480-486.

Wales, M.E. (2009). Understanding the role of convenience in consumer food choices: a review article. *Studies by Undergraduate Researchers at Guelph*, 2, 40-48. Disponível em: <https://journal.lib.uoguelph.ca/index.php/surg/article/view/983/1431>

Wang, C., Chang, T., Yang, H. & Cui, M. (2014). Surface physiological changes induced by lactic acid on pathogens in consideration of pKa and pH. *Food Control*, 46, 525–531.

Wang, C., Chang, T., Yang, H. & Cui, M. (2015). Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 47, 231–236.

Wang, C., Wang, S., Chang, T., Shi, L., Yang, H., Shao, Y., Feng, W. & Cui, M. (2013). Efficacy of lactic acid in reducing foodborne pathogens in minimally processed lotus sprouts. *Food Control*, 30, 721-726.

Warriner, K. & Namvar, A. (2013). Recent advances in fresh produce post-harvest decontamination technologies to enhance microbiological safety. *Stewart Postharvest Review*, 9, 1-8.

WHO - World Health Organization (2004). Fruit and Vegetables for Health. *Report of a joint FAO/WHO workshop, Kobe, Japan*. Disponível em: [http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/fruit\\_vegetables\\_report.pdf](http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/fruit_vegetables_report.pdf)

WHO - World Health Organization (2011). Outbreaks of *E. coli* O104:H4 Infection: Update 30. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30>

WHO - World Health Organization (2016). Promoting fruit and vegetable consumption around the world. *Programme: Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health*. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>

Wu, V.C.H. & Kim, B. (2007). Effect of a simple chlorine dioxide method for controlling five foodborne pathogens, yeasts and molds on blueberries. *Food Microbiology*, 24, 794-800.

von Wright, A. (2012). Genus *Lactococcus*. In S., Lahtinen, A., Ouwehand, S., Salminen, A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (pp. 63-76). New York, EUA: Taylor and Francis.

von Wright, A. & Axelsson, L. (2012). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In S. Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen, A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (pp. 1-16). New York, USA: Taylor and Francis.

Xia, X., Luo, Y., Yang, Y., Vinyard, B., Schneider, K. & Meng, J. (2012). Effects of tomato variety, temperature differential, and post-stem removal time on internalization of *Salmonella enterica* serovar Thompson in tomatoes. *Journal of Food Protection*, 75, 297–303.

Zacharof, M. & Lovitt, R., (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*. 2, 50–56.

Zaho, Y. (2005). Pathogens in fruit. In: W. Jongen (Ed.), *Improving the safety of fresh fruit and vegetables*, pp 44-88. Cambridge, UK, Woodhead Publishing Limited.

Zhang, G., Ma, L., Phelan, V.H. & Doyle, M.P. (2009). Efficacy of antimicrobial agents in lettuce leaf processing water for control of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 72, 1392-1397.

## **CAPÍTULO 2:**

### **RESULTADOS PRELIMINARES**

Essential oils as antibacterial agents against food-borne pathogens: are they really as useful as they are claimed to be?

M. I. S. Santos<sup>1,3,4</sup>, C.S.C. Veríssimo<sup>1</sup>, M.J. C. Nunes<sup>1</sup>, A. I. G. Lima<sup>3</sup>, R. M. S. B. Ferreira<sup>3</sup>, L. Pedroso<sup>4</sup>, I. Sousa<sup>2</sup> & M. A. S. S. Ferreira<sup>1\*</sup>

Artigo submetido na Revista: **LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY**, Manuscript ID: **LAM-2017-0104**.

Alguns resultados constantes neste capítulo foram apresentados em:

Nunes, MJC, Veríssimo, CSC, Valente, F., Santos, MI, Pedroso, L., Sousa, I. Ferreira, M.A.S.S. (2012). Determination of Minimal Inhibitory and Microbicidal Concentrations of Essential Oils Produced by Mediterranean Plants, 43<sup>rd</sup> International Symposium on Essential Oils, ISEO, book of proceedings, A.Figueiredo, J.G.Barroso & L.G.Pedro Eds., ISBN: 978-989-20-3188-0, page 76, 5 to 8 September , Lisbon, Portugal.

## **Essential oils as antibacterial agents against food-borne pathogens: are they really as good as they seem?**

M. I. S. Santos<sup>1,3,4</sup>, C.S.C. Veríssimo<sup>1</sup>, M.J. C. Nunes<sup>1</sup>, A. I. G. Lima<sup>3</sup>, R. M. S. B. Ferreira<sup>3</sup>, L. Pedroso<sup>4</sup>, I. Sousa<sup>2</sup> & M. A. S. S. Ferreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Microbiology Laboratory, Department of Natural Resources, Environment and Territory, DRAT, LEAF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal

<sup>2</sup> Eco-novel Food &Feed, LEAF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal

<sup>3</sup> Disease & Stress Biology, DRAT, LEAF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal

<sup>4</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Lusofona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisbon, Portugal

Running title: *Essential oils as antibacterial agents against food-borne pathogens*

\*Corresponding author: [massferreira@isa.ulisboa.pt](mailto:massferreira@isa.ulisboa.pt)

## Abstract

A popular approach to prevent microorganism proliferation in food products is based on the use of essential oils (EO) extracted from plants, particularly herbs and spices. However, most studies focus on minimal inhibitory concentrations (MIC), rather than minimal bactericidal concentrations (MBC), which are much more important in the case of food-borne pathogens. In this work, we determined MICs as well as MBCs of EO from condiment plants commonly used in Mediterranean Europe, namely *Origanum vulgare*, *Salvia lavandulaefolia*, *Salvia officinalis*, *Salvia sclarea* and *Rosmarinus officinalis*, aiming for a possible application as disinfecting agents in minimally processed produce. Representative food pathogens identified in recent outbreaks and deterioration microorganisms were selected, with particular attention given to *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Yarrowia lipolytica*. MICs were determined in microtiter plates by the microdilution method, over concentrations ranging from 0.03 to 900  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . MBC were achieved by a magnifying factor of the MIC value obtained for each oil and showed a wide span of variation.

Results showed that all EO were able to reduce bacterial growth in all species tested, particularly *O. vulgare*, presenting MICs comprised between 0.03  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and 1.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , whereas other oils presented MICs ranging from 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  up to 900  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . However, the bactericidal concentration required in all EO were always very elevated and even so, not effective for all bacterial strains, hence eliminating the possibility to use them as broad range disinfectants. These results suggest the need to evaluate MBC rather than MIC when selecting EO in food disinfection and question their usefulness in controlling undesired microorganisms.

Indeed, it was noted that the odour of some of these EO at bactericidal concentrations was very strong, hence limiting its use in food products. A search was performed in the available literature and a similar range of concentrations was found, which could render these EO toxic for consumption or with a too strong odour to be viable. Overall, and despite the large volume of data published on EO, the results obtained in this research were not very encouraging for a realistic application on produce and question the viability of EOs as disinfecting agents in food.

Key words: disinfection; essential oils; food safety; pathogens; vegetables; spoilage



## 1. Introduction

Foodborne diseases of microbiological origin constitute a major food safety concern, posing an ever growing problem on public health. One of the main factors aiding to this situation is the high consumption of "ready to eat" minimally processed (MP) fresh-cut fruit and vegetables (Rojas-Graü, Garner & Martin-Belloso, 2010), because they are naturally contaminated with microorganisms (Martinez-Sanchez, Allende, Bennett, Ferreres & Gil, 2006; Karagözlü, Ergönül & Özcan 2011). Currently, outbreaks attributed to the consumption of MP produce have been dramatically increasing around the world, involving thousands of people, many of which end up dying (Frank *et al.*, 2011; King *et al.*, 2012; Painter *et al.*, 2013, Callejón *et al.*, 2015; EFSA, 2015; CDC, 2016). Several studies have isolated pathogens from MP lettuce including *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157: H7, *Shigella* spp. and *Campylobacter* spp. (Nguyen-the & Carlin, 2000; Szabo, Scurra & Burrows, 2000; Gombas, Chen, Clavero & Scott, 2003; Francis, Thomas & O'Breirne, 2006; Lianou & Sofos, 2007; Santos, 2009; Santos *et al.*, 2012; Jamali, Chai & Thong, 2013). In Portugal, Santos (2009) detected *Enterobacteriaceae* at a level of  $5.44 \log \text{cfu.g}^{-1}$  in MP salads, where the genera *Erwinia* spp., *Pantoea* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. were present. In the same work, *Citrobacter freundii*, *Leclercia adecarboxylata* and *Hafnia alvei* were also identified, as well as *Aeromonas* and *Pseudomonas*. It is important to note that MP vegetables are foodstuffs which have not gone through any step to ensure the absence of any health risk associated with its consumption, since they were not subjected to treatments to ensure safe levels of pathogens, spores or toxins. Thus, disinfection is a critical step on food safety warranty in MP produce and needs to be seriously addressed.

At the industrial level, in most countries, disinfection with chlorine-based products is the only step which allows pathogen destruction and promotes food safety (Gil, Selma, López-Gálvez & Allende, 2009). However, there is a growing concern about the environmental and health risks associated to chlorine agent's conversion into carcinogenic toxic derivatives, such as trihalomethanes and chloramines, which already face restrictions in their uses (Parish *et al.*, 2003; Sapers, 2003; Martin-Diana, Rico, Frias & Mulcahy, 2006; Ölmez & Kretzschmar, 2009; Francis, *et al.*, 2012). On the other hand, the increasing demand for "natural" and "environmentally friendly" products has led to a need to replace chemical disinfectants and additives in the food industry, aiming for new food preservatives, which may be effective and safe, whilst reducing microbial loads and avoiding food allergies and/or intolerances.

Essential oils (EOs) are liquid aromatic products extracted from aromatic plants (*Lamiaceae*), which are soluble in lipids and in organic solvents. The benefits of EOs for therapeutic purposes have been suggested since immemorial times, but it was only in recent years that studies have arisen reporting the EO-induced inhibition of pathogenic bacteria and the shelf-life increase of processed food products

(Burt, 2004; Oussalah, Caillet, Saucier & Lacroix, 2006; Kotzekidou, Giannakidis & Boulamatsis, 2008; De Martino, De Feo, Formisano, Mignola & Senatore, 2009; Rožman & Jeršek, 2009; Tian *et al.*, 2011), as well as their use in edible coatings in fresh produce and fruits (Azevedo *et al.*, 2014; Oriani, Molina, Chiumarelli, Pastore, & Hubinger, 2014; Guerreiro, Gago, Faleiro, Miguel & Antunes, 2015a; Guerreiro, Gago, Faleiro, Miguel & Antunes, 2015b; Guerreiro, Gago, Faleiro, Miguel & Antunes, 2015c; Sessa, Ferrari & Donsì, 2015).

Although they have been the subject of many works, most studies on EO focus on MIC determinations, rather than MBCs. However, the latter are much more important in food safety and industrial-scale sanitizers, where the complete elimination of food-borne pathogens from processed fruits and vegetables is required. A PubMed search for research in antibacterial activities of EOs applied to food products, such as meat, fresh fruit and lettuce, shows approximately 600 papers, all with MIC determinations; however, MBC determinations were performed in less than 10 reports. As MBCs are usually higher than MICs, it is important to take this into consideration when selecting EO for this purpose, because of their strong odour and potential toxicity as it was demonstrated for more than 200  $\mu\text{L}$  of *Salvia officinalis* L. (Lima *et al.*, 2004). Under this context, the objective of this study was to evaluate EOs from plants normally used as condiments in Mediterranean Europe (*Origanum vulgare*, *Salvia lavandulaefolia*, *Salvia officinalis*, *Salvia sclarea* and *Rosmarinus officinalis*), for their antibacterial activity against the most significant pathogenic and food-spoilage microorganisms that have been identified in outbreaks linked to MP salads (Santos *et al.*, 2012), namely *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Yarrowia lipolytica*. Both MICs and MBCs were determined and compared, aiming to design a possible EO-based disinfection/sanitation strategy to use in MP vegetables.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Bacterial strains and preparation of cultures

The strains used in this assay were *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 (serotype 4b), *L. monocytogenes* CP6 (PFGE type 11), *L. monocytogenes* M12 (PFGE type 3), *Pseudomonas aeruginosa* P2, *P. aeruginosa* P6, *Yarrowia lipolytica* CBS 6659, *Y. lipolytica* ISA 1668 and *Y. lipolytica* ISA 1708. For bacterial growth, tripticase soy agar medium (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) was used, supplemented with 0.6 % (w/v) yeast extract (TSA-YE) (Oxoid, Hampshire, United Kingdom), incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  during  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . Yeast strains were cultivated on glucose yeast peptone agar (GYA): 5  $\text{g L}^{-1}$  yeast extract (Oxoid, Hampshire, United Kingdom), 5  $\text{g L}^{-1}$  meat peptic peptone (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), supplemented with 2  $\text{g L}^{-1}$  glucose (COPAM, Portugal), and 20  $\text{g L}^{-1}$  agar-agar (Dário Correia, Portugal). Incubation was performed at  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  during  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . Serial

dilutions of cultures were prepared using Ringer Solution (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for inocula evaluations.

For MIC assays, tripticase soy broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), supplemented with 6 g L<sup>-1</sup> yeast extract (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) containing 0.8 % (v/v) Tween 80 (TSB-YE-T) (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, United States of America) was used for bacteria and glucose yeast peptone broth (as referred above without agar) also containing 0.8 % (v/v) Tween 80 (GYP-T) for yeasts.

## 2.2. Essential oil

EOs derived from the following plants were used: *Origanum vulgare*, *Salvia lavandulaefolia*, *Salvia officinalis*, *Salvia sclarea* and *Rosmarinus officinalis*. The concentrated extracts were provided by the company Polarome International, United States of America.

## 2.3. Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration determinations

The determination of both MIC and MBC were performed according to the method described by Cosentino *et al.* (1999) with modification for the media used. Briefly, MIC determinations were made in 96-well microtiter plates (Nunclon™, Roskilde, Denmark) disposing in each well a volume of 50 µL medium, TSA-YE-T or GYP-T, and 50 µL of a specific concentration, sequentially two-fold diluted over the range of concentrations ranging from 900 to 0.03 µg.mL<sup>-1</sup> for each EO. Then, each well was inoculated with 50 µL of microbial suspensions, to reach a final concentration of ca. 5x10<sup>5</sup> cfu mL<sup>-1</sup>, as evaluated by OD<sub>600</sub> readings and taken from a previously obtained calibration curve. Positive and negative controls were also carried out and plates were incubated for 24 h ± 2 h at 37 °C ± 1 °C for bacteria and for 48 h ± 2 h at 25 °C ± 1 °C for yeasts. After incubation, absorbance was read at 600 nm using a Microplate Reader Mode 680 (BioRad, Hemel Hempstead, United Kingdom). Once all MICs were determined, the OE with higher activities were selected and tested, magnifying 1 to 18 times their MIC values for MBC evaluation, by the macro dilution method using 20 mL of the same media, 1 mL of inocula and under the assay incubations described above. After incubation periods of 24 or 48 h, 100 µL of each tube was spread on TSA-YE-T for bacteria and on GYP-T for yeasts, for cell viability evaluation. Each assay was performed in duplicate in two independent trials.

## 2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R software, version 2.12.1. Microsoft Excel 2007 and OriginPro 8 software's were also used.

### 3. Results and discussion

It is a well-known fact that EOs seem to exhibit large antimicrobial spectra against bacteria, yeasts and molds (Oussalah *et al.*, 2006). In this work, we determined the minimum inhibitory concentrations as well as the minimal bactericidal activities of specific EO from condiment plants used in Mediterranean Europe, namely *Origanum vulgare*, *Salvia lavandulaefolia*, *Salvia officinalis*, *Salvia sclarea*, and *Rosmarinus officinalis*. The EO from oregano (*O. vulgare*) is widely used as a flavoring component in pizzas, lasagnas and sauces and can be effective against pathogenic bacteria (Sahin *et al.*, 2004; Vasudeva & Vasudeva, 2015). Sage oil (*Salvia lavandulaefolia*) is used by the food industry and in pharmaceutical recipes (Pinto, Salgueiro, Cavaleiro, Palmeira & Gonçalves, 2007). Rosemary EO (*R. officinalis*) has been used in food as a flavoring, antioxidant, antiseptic and preservative to prevent the attack of fungi and other microorganisms (Ucak, Ozogul & Durmus, 2011).

Since our aim was to ascertain possible applications of these EOs as disinfecting agents in minimally processed produce, representative food pathogens identified in recent outbreaks and deterioration microorganisms were selected, particularly *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Yarrowia lipolytica*.

Firstly, antibacterial activities were tested, and the MIC results obtained for all EOs and microorganisms under study are shown in Table 1.

Table 1. MIC determinations of strains and essential oils tested\*

Microorganisms	Essential oil source				
	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Salvia lavandulaefolia</i>	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994	0.03	225.0	28.13	112.5	28.13
<i>L. monocytogenes</i> CP6	0.06	225.0	14.06	450.0	14.06
<i>L. monocytogenes</i> M12	0.03	225.0	28.13	450.0	7.03
<i>P. aeruginosa</i> P2	0.06	900.0	112.5	225.0	28.13
<i>P. aeruginosa</i> P6	0.06	225.0	112.5	225.0	450.0
<i>Y. lipolytica</i> ISA 1668	0.11	225.0	7.03	28.13	28.13
<i>Y. lipolytica</i> ISA 1708	1.76	112.5	3.52	28.13	56.30
<i>Y. lipolytica</i> CBS 6659	0.06	11.25	112.5	7.03	14.06

Note:\* Results presented reflect the average of four different replicates, expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (w/v) of oil in growth media.

Analysis of the data reveal that all EOs were able to reduce bacterial growth, in all strains, but statistically their MIC values varied very significantly among them ( $P < 0.001$ ). Overall, all strains were more sensitive to *O. vulgare* EO ( $P < 0.001$ ), which presented the lowest MIC values, comprised between 0.03 and 1.76  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  when compared to the other oils where MIC values were much higher (from 20 up to 900  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). It was also noted that the majority of bacterial strains studied here, was less sensitive to *S. sclarea* ( $P < 0.001$ ), requiring minimal concentrations of 112.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  up to 900  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , which would be unrealistic to use. Although using different methods, Souza, Stamford, Lima & Trajano (2007) also found good inhibitions for similar EOs, with MIC values varying between 0.26 and 1.25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for various food spoilage yeast strains with *O. vulgare* EO, whereas Cleff *et al.* (2010) found MIC values between 0.21 and 0.50 % (v/v) for strains of *Candida* spp. Another work with this EO demonstrated a good antibacterial activity on several strains tested (Dobre, Gagiu & Petru, 2001). With *R. officinalis* EO, Rožman & Jeršek (2009) also found a good antimicrobial activity against several strains of *Listeria*, as we did encountered in our work for the strain studied. Gachkar *et al.* (2007) have studied *R. officinalis* EO action against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *L. monocytogenes* and found a good to moderate activity with all strains as well.

It is somewhat surprising to realize that none of these studies evaluate the bactericidal effect of EO, since they are required for a scaling-up purpose to establish a standard process of disinfection. In this work we also evaluated MBC values, as shown in Table 2. Only some selected strains and the EOs with better outcomes in Table 1 were selected for this purpose, as follows: *L. monocytogenes* NCTC 11994, *P. aeruginosa* P2 and *Y. lipolytica* ISA 1708, OEs from *O. vulgare*, *S. lavandulaefolia* and *R. officinalis*.

Table 2. MBC determinations of the strains and the essential oils tested\*\*

Microbial strains	Essential oil source		
	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Salvia lavandulaefolia</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994	7.2	56.2	56.2
<i>P. aeruginosa</i> P2	12	NT*	56.2
<i>Y. lipolytica</i> ISA 1708	3.52	63.36	>25

Note: \* NT, not tested, because MIC values were too high; \*\* Results presented reflect the average of four different replicates each expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (w/v) of oil in growth media.

Results show that although MIC determinations (Table 1) suggested that several EO seemed to be potentially good disinfectants, no bactericidal effect was obtained by increasing the volume tested from 150  $\mu\text{L}$  to 20 mL for MBC evaluation in most strains tested, because a too high concentration of EO was required, which, for example in the case of *S. lavandulaefolia*, would be potentially nephrotoxic and neurotoxic according to previous works (Pinto *et al.*, 2007). Comparing to results obtained with MIC determinations, these figures highlight the importance of determining MBC values

in addition to MIC values in these type of studies, to effectively evaluate the EO viability as disinfectant under real situations.

Comparing the oils, *O. vulgare* still shows to be the most effective ( $P < 0.001$ ), followed by *R. officinalis*. However, unlike with MIC values, the EOs studied were not effective for all strains when MCB values were considered: these were only obtained for *Y. lipolytica* with *O. vulgare* EO ( $3.52 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), *L. monocytogenes* with *R. officinalis* EO ( $37.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and *S. lavandulaefolia* EO ( $63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). These results point that the bactericidal effect differs among strains and with the EO itself, hence reducing their potential use as broad-range disinfectant agents.

The possibility of using different EO combinations to reach a broader disinfecting effect has been suggested by other authors (Azevedo *et al.*, 2014). This could be of significant importance to the use of EOs in films and other applications such as edible coatings (Guerreiro, *et al.*, 2015a; Guerreiro, *et al.*, 2015b; Guerreiro, *et al.*, 2015c). Nonetheless, in this work, the high percentages of these EOs was found to induce an unpleasant strong odour, which would limit their use in food products. Frangos, Pyrgotou, Giatrakou, Ntzimani, & Savvaidis (2010) noticed that the presence of salt and oregano oil (0.2 % v/w) in cooked trout samples produced a distinct but sensorial acceptable pleasant odour, well received in sensorial analysis, but in contrast to the combined effect of salt and oregano oil at higher concentrations (0.4 % v/w) which was found unpleasant to the panelists.

Mejlholm & Dalgaard (2002) corroborate that for many EOs, over  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  are required to extend product shelf-life. Accordingly to these authors, such high levels often convey a very strong flavor, hence they can only be primarily useful in sauces and products that are mixed with other strongly-flavored food ingredients. Even so, there is a substantial amount of work suggesting the potential use of EOs in food produce. A comparison between MBC and MIC values found in the available research literature in this area is shown in Table 3. All reports concluded the need to use very high levels of EOs to reach MBC values (over  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and often much more). Such concentrations are likely to induce strong odour, limiting practicality of their use by the food industry. Furthermore, there is the additional risk that, at these levels of concentration, EOs may exhibit toxicity for human consumption as well. Such is the case of sage EO, which is interdicted, when in high concentrations, from beverages in most European countries because of its high toxicity (Lima *et al.*, 2004).

Furthermore, it has been shown that although EOs may show a good performance in antimicrobial assays performed *in vitro*, some studies have demonstrated that even greater concentrations of EOs are necessary to obtain a similar results in food products (Burt, 2004).

So, a basic but fundamental question arises: although they are unequivocally good antibacterial agents, are EO suitable for industrial-scale MP food products? Our results, as well as the results from other reports, suggest that perhaps not, at least, not in the MP produce food context.

If we also consider that the antimicrobial activity displayed by each EO may vary due to several factors like: i) the environmental conditions including soil and climate where the producing plant is grown, ii) the part of the plant extracted, iii) the time of harvest, iv) the age of the plant, v) the extract concentration (Bakkali, 2008), and also, vi) the extraction method (Burt, 2004), then the antimicrobial activity reproducibility becomes hard to obtain (Cosentino *et al.*, 1999; Faleiro *et al.*, 2003), which would render EOs even less practical to be used at an industrial scale.

Other authors (Miguel, 2010; Azevedo *et al.*, 2014) have suggested that the use of a single compound instead of the whole mixture comprising each EO, is a better approach. Pirie and Clayson (1964) proposed that EOs can only be primarily useful in sauces and products that are mixed with other food ingredients. On the other hand, some recent studies indicated the possibility of using EOs in synergy with other antimicrobial agents, such as nisin or lysozyme, which could be a possibility for the use of lower concentrations of EOs, thus decreasing the potential toxicity of these compounds (Ettayebi, Yamani & Rossi-Hassani, 2000; Dehkordi, Rohani, Tajik, Moradi & Aliakbarlou, 2008). Therefore, the use of EOs can still be a promising natural and effective way to prevent microorganism proliferation in food products, albeit the need to reevaluate their application.

Table 3: MIC and MBC values of essential oils or their components tested in vitro against food borne pathogens in several recent studies.

EO	MIC (w/v)	MBC (w/v)	Microbial target	References
<i>Rosmarinus officinalis</i>	4.4 mg/ml	4.4 mg/ml	<i>Escherichia coli</i>	Mathlouthi <i>et al.</i> , 2015
	8.8 mg/ml	NA	<i>Salmonella</i> Indiana	
	8.8 mg/ml	NA	<i>Listeria innocua</i>	
	NA	NA	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	NA	NA	<i>Bacillus subtilis</i>	
	10.0 mg/ml	10.0 mg/ml	<i>Clostridium perfringens</i>	Radaelli <i>et al.</i> 2016
	25 mg/mL	50 mg/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 1408	Miladi <i>et al.</i> , 2016
	25 mg/mL	50 mg/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium LT2 DT104	
			<b>S. strains isolated from food</b>	
	12.5 mg/mL	25 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S1: 6554)	
	12.5 mg/mL	25 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S2: 6877)	
	12.5 mg/mL	50 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S3: 6907)	
	25 mg/mL	50 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S4: 7215)	
	25 mg/mL	50 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S5: 7466)	
	12.5 mg/mL	25 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S6: 7643)	
	12.5 mg/mL	50 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S7: 7945)	
	12.5 mg/mL	25 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S8: 9487)	
	12.5 mg/mL	25 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S9: 9340)	
	12.5 mg/mL	25 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S10: 9681)	
	12.5 mg/mL	25 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S11: 9812)	
	25 mg/mL	50 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S12: 9983)	
<i>Origanum sp.</i>	0.9 mg/mL	1.12 mg/mL	<i>Escherichia coli</i>	Mathlouthi <i>et al.</i> , 2015
	0.9 mg/mL	1.12 mg/mL	<i>Salmonella</i> Indiana	
	0.9 mg/mL	1.12 mg/mL	<i>Listeria innocua</i>	
	0.9 mg/mL	1.12 mg/mL	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	2.25 mg/mL	2.25 mg/mL	<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Origanum majorana</i>	5.0 mg/mL	5.0 mg/mL	<i>Clostridium perfringens</i>	Radaelli <i>et al.</i> 2016

(continued on next page)



Table 3 (continued)

EO	MIC (w/v)	MBC (w/v)	Microbial target	References
<i>Origanum vulgare</i> ecotype F	50 µg/mL	50 µg/mL	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	De Martino <i>et al.</i> , 2009
	50 µg/mL	50 µg/mL	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	
	50 µg/mL	50 µg/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592	
	50 µg/mL	100 µg/mL	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	
	50 µg/mL	100 µg/mL	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
	100 µg/mL	100 µg/mL	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	
	100 µg/mL	>100 µg/mL	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	
	>100 µg/mL	>100 µg/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	100 µg/mL	100 µg/mL	<i>Salmonella</i> Typhi Ty2 ATCC 19430	
<i>Origanum vulgare</i> ecotype S	50 µg/mL	50 µg/mL	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	
	50 µg/mL	100 µg/mL	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	
	50 µg/mL	50 µg/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592	
	50 µg/mL	100 µg/mL	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	
	100 µg/mL	100 µg/mL	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
	100 µg/mL	100 µg/mL	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	
	100 µg/mL	100 µg/mL	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	
	>100 µg/mL	>100 µg/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	100 µg/mL	100 µg/mL	<i>Salmonella</i> Typhi Ty2 ATCC 19430	
<i>Origanum vulgare</i> ecotype SG	50 µg/mL	100 µg/mL	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	
	50 µg/mL	100 µg/mL	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	
	100 µg/mL	100 µg/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592	
	100 µg/mL	100 µg/mL	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	
	100 µg/mL	100 µg/mL	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
	>100 µg/mL	>100 µg/mL	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	
	>100 µg/mL	>100 µg/mL	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	
	>100 µg/mL	>100 µg/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	>100 µg/mL	>100 µg/mL	<i>Salmonella</i> Typhi Ty2 ATCC 19430	
<i>Origanum compactum</i>	0.5 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Mith <i>et al.</i> , 2014
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> S0580	

(continued on next page)

Table 3 (continued)

EO	MIC (w/v)	MBC (w/v)	Microbial target	References
<i>Origanum compactum</i>	0.5 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	
	0.25 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium S0584	
	0.25 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	
	0.5 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 S0575	
<i>Origanum heracleoticum</i>	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Mith et al., 2014
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> S0580	
	0.125 µL/mL	0.125 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium S0584	
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 S0575	
<i>Mentha piperita</i>	10.0 mg/ml	10.0 mg/ml	<i>Clostridium perfringens</i>	Radaelli et al. 2016
<i>Ocimum basilicum</i>	5.0 mg/ml	5.0 mg/ml		
<i>Pimpinella anisum</i>	10.0 mg/ml	20.0 mg/ml		
	1.25 mg/ml	1.25 mg/ml		
<i>Thymus vulgaris</i>	1.56 mg/mL	3.12 mg/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 1408	Miladi et al., 2016
	1.56 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium LT2 DT104	
			<b>S. strains isolated from food</b>	
	1.56 mg/mL	3.12 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S1: 6554)	
	1.56 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S2: 6877)	
	1.56 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S3: 6907)	
	1.56 mg/mL	3.12 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S4: 7215)	
	1.56 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S5: 7466)	
	1.56 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S6: 7643)	
	0.78 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S7: 7945)	
	1.56 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S8: 9487)	
	0.78 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S9: 9340)	
	1.56 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S10: 9681)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S11: 9812)	
	1.56 mg/mL	1.56 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S12: 9983)	
<i>Thymus vulgaris thymoliferum</i>	0.5 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Mith et al., 2014
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> S0580	

(continued on next page)

Table 3 (continued)

EO	MIC (w/v)	MBC (w/v)	Microbial target	References
<i>Thymus vulgaris thymoliferum</i>	0.25 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	
	0.25 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium S0584	
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	
	0.25 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 S0575	
<i>Thymus capitatus</i>	0.5 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Mith et al., 2014
	0.5 µL/mL	1 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> S0580	
	1 µL/mL	1 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	
	0.5 µL/mL	1.5 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium S0584	
	0.5 µL/mL	1 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 S0575	
<i>Thymus daenensis</i>	4.0 mg/mL	4.0 mg/mL	<i>Escherichia coli</i>	Moghimi et al., 2016
<i>Satureja montana</i>	0.78 mg/mL	0.78 mg/mL	<i>Salmonella</i> typhimurium ATCC 1408	Miladi et al., 2016
	0.78 mg/mL	0.78 mg/mL	<i>Salmonella</i> typhimurium LT2 DT104	
			<b>S. strains isolated from food</b>	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S1: 6554)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S2: 6877)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S3: 6907)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S4: 7215)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S5: 7466)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S6: 7643)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S7: 7945)	
	0.39 mg/mL	0.78 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S8: 9487)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S9: 9340)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S10: 9681)	
	0.39 mg/mL	0.39 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S11: 9812)	
	0.39 mg/mL	0.78 mg/mL	<i>Salmonella</i> spp (S12: 9983)	
<i>Cinnamomum cassia</i>	0.5 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Mith et al., 2014
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> S0580	
	0.25 µL/mL	1 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	
	0.25 µL/mL	1 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium S0584	
	0.5 µL/mL	1 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	
	0.25 µL/mL	0.25 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 S0575	

(continued on next page)

Table 3 (continued)

EO	MIC (w/v)	MBC (w/v)	Microbial target	References
<i>Cinnamomum verum</i>	0.5 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Mith et al., 2014
	0.25 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> S0580	
	0.5 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	
	0.5 µL/mL	1 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium S0584	
	0.5 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	
	0.25 µL/mL	0.5 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 S0575	
<i>Eugenia caryophyllus</i>	1 µL/mL	>1.5 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	
	1 µL/mL	>1.5 µL/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> S0580	
	1 µL/mL	1.5 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	
	1 µL/mL	1.5 µL/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium S0584	
	1 µL/mL	1 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	
	1 µL/mL	1 µL/mL	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 S0575	

NA: no antimicrobial activity; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MBC Minimum Bactericide Concentration

## 4. Conclusion

In this work, although all EOs tested presented good antibacterial effects towards an array of pathogenic bacteria associated with food contamination and spoilage, only *O. vulgare*, *S. lavandulaefolia* and *R. officinalis* presented any bactericidal action but solely against specific strains, suggesting a limited use of EOs as food disinfectants in MP produce. Furthermore, the concentrations required for antimicrobial activity were too high for the desired purpose of food application and in some cases originated very intense, unpleasant odours. Overall, this work highlights that the application of EOs in foods needs to be further addressed in relation to its practical applicability and efficacy.

## Acknowledgments

Authors would like to thank Dr. Alexandra Carreira and Cristina Pintado for the yeast and bacteria strains used and Polarome International, USA for kindly providing the EO.

## References

- Azevedo, A.N., Buarque, P.R., Cruz, E.M.O., Blank, A.F., Alves, P.B., Nunes, M.L. & Santana, L.C.L.A. (2014). Response surface methodology for optimization of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. *Food Control* 43, 1–9.
- Bakkali, F. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Callejón, R. M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C. & Troncoso, A.M. (2015). Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the united states and european union: trends and causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12, 32-38.
- Cleff, M.B., Meinerz, A.R., Xavier, M., Schuch, L.F., Meireles, M.C.A., M.R.A., Rodrigues & Mello, J.R.B. (2010). In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 116-123.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2016). Multistate outbreak of listeriosis linked to packaged salads produced at Springfield, Ohio Dole processing facility. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html> Accessed on 03.02.16.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. Mascia, V., Arzedi, E. & Palmas, F. (1999). *In-vitro*

antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130-135.

Dehkordi, S.S.S., Rohani, S.M.R., Tajik, H., Moradi, M. & Aliakbarlou, J. (2008). Antimicrobial effects of lysozyme in combination with *zataria multiflora* boiss. essential oil at different pH and NaCl concentrations on *E. coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7, 1458-1463.

De Martino, L., De Feo, V., Formisano, C., Mignola, E. & Senatore, F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L.ssp. *hirtum* (Link) letswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*, 14, 2735-2746.

Dobre, A., Gagi, V. & Petru, N. (2011). Antimicrobial activity of essential oils against food-borne bacteria evaluated by two preliminary methods. *Romanian Biotechnological Letters*, 16, 119-125.

EFSA (European Food Safety Authority) (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015, 13(12):4329.

[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/4329.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4329.pdf)

Accessed on 14.01.16.

Ettayebi, K., Yamani, J.E. & Rossi-Hassani, B. (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 183, 191-195.

Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venâncio, F., Tavares, R., Brito, J.C., ...Pedro, L. G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35-40.

Francis, G.A., Gallone, A., Nychas, G.J., Sofos, J.N., Colelli, G., Amodio, M.L. & Spano, G. (2012). Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 595-610.

Francis, G.A., Thomas, C. & O'Breirne, D. (2006). Isolation and pulsed-field gel electrophoresis typing of *Listeria monocytogenes* from modified atmosphere packaged fresh-cut vegetables collected in Ireland. *Journal of Food Protection*, 69, 2524-58.

Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. & Savvaidis, I.N. (2017). Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. *Food Microbiology*, 27, 115-121.

- Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., Heiden, M. ... Krause, G. (2011). Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *The New England Journal of Medicine*, 365, 1771-1780.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102, 898-904.
- Gil, M.I., Selma, M.V., López-Gálvez, F. & Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 37-45.
- Gombas, D., Chen, Y., Clavero, R. & Scott, V. (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. *Journal of Food Protection*, 66, 559-569.
- Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C. & Antunes, M.D.C. (2015a). Raspberry fresh fruit quality as affected by pectin and alginate-based edible coatings enriched with essential oils. *Scientia Horticulturae*, 194, 138-146.
- Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C. & Antunes, M.D.C. (2015b). The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 226-233.
- Guerreiro, A.C., Gago, C.M.L., Faleiro, M.L., Miguel, M.G.C. & Antunes, M.D.C. (2015c). The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 51-60.
- Jamali, H., Chai, L.C. & Thong, K.L. (2013). Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control*, 32, 19-24.
- Karagözlü, N., Ergönül, B. & Özcan, D. (2011). Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. *Food Control*, 22, 1851-1855.
- King, L.A., Nogareda, F., Weill, F. X., Mariani-Kurkdjian, P., Loukiadis, E., Gault, G., Jourdan-DaSilva, N., Bingen, ... & de Valk, H. (2012). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011. *Clinical and Infectious Diseases*, 54, 1588–1594.
- Kotzekidou, P., Giannakidis, P. & Boulamatsis, A. (2008). Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 119–127.

Lianou, A. & Sofos, J.N. (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection*, 70, 2172-2198.

Lima, C.F., Carvalho, F., Fernandes, E., Bastos, M.L., Santos-Gomes, ...Wilson, C. (2004). Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 18, 457-465.

Martin-Diana, A., Rico, D., Frias, J. & Mulcahy, J. (2006). Whey permeate as a bio-preservative for shelf life maintenance. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 112 – 123.

Martinez-Sanchez, A., Allende, A., Bennett, R.N., Ferreres, F. & Gil, M.I. (2006). Microbial, Nutritional and Sensory Quality of Rocket Leaves as Affected by Different Sanitizers. *Postharvest Biology and Technology*, 42, 86-97.

Mathlouthi, N., Bouzaïenne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M. & Bergaoui, R. (2015). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *Journal of Animal Science*, 90, 813-823.

Mejlholm, O. & Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 27-31.

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 291-312.

Miladi, H., Mili, D., Slama, R.B., Zouari, S., Ammar, E. & Bakhrouf, A. (2016). Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis*, 93, 22-31.

Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube1, G. & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2, 403-416.

Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A. & McClements, D.J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry* 194, 410-415.



Nguyen-the, C. & Carlin, F. (2000). Fresh and Processed Vegetables. In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker & G.W. Gould, (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 622-84). Gathersburg, EUA: Aspen Publication.

Ölmez, H. & Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 686-693.

Oriani, V.B., Molina, G., Chiumarelli, M., Pastore, G.M. & Hubinger, M.D. (2014). Properties of cassava starch-based edible coating containing essential oils. *Journal of Food Science*, 79, E189-E194.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73, 236–244.

Painter, J.A., Hoekstra, R.M., Ayers, T., Tauxe, R.V., Braden, C.R., Angulo, F.J. & Griffin, P.M. (2013). Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 407-415.

Parish, M.E., Beuchat, L.R., Suslow, T.V., Harris, L.J., Garrett, E.H., Farber, J.N. & Busta, F.F. (2003). Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 161-173.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00033.x/pdf>. Accessed on 15.12.15.

Pinto, E., Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Palmeira, A. & Gonçalves, M.J. (2007). *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 26, 135–141.

Radaelli, M., Silva, P., Weidlich, L., Hoehne, L., Flach, A., Costa, L.A.M.A. & Ethur, E.M. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 424-430.

Rojas-Graü, M.A., Garner, E. & Martin-Belloso, O. (2010). The Fresh-Cut Fruit and Vegetables Industry Current Situation and Market Trends. In O. Martin-Belloso & R. Soliva-Fortuny (Eds.), *Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing* (pp. 1-11). Boca Raton, USA: CRC Press.

Rožman, T. & Jeršek, B. (2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 93, 51 – 58.

- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Agar, G. & Ozer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15, 549–557.
- Santos, M.I. (2009). Estimativa da flora microbiana e eventuais patogénicos em saladas minimamente processadas (MP) prontas para consumo (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Santos, M.I., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M.R., Nogueira, P.J., Pedroso, L. & Ferreira, M.A.S.S. (2012). Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control*, 23, 275-281.
- Sapers, G.M. (2003). Washing and Sanitizing Raw Materials for Minimally Processed Fruits and Vegetables. In J.S. Novak, G.M. Sapers & V.K. Juneja (Eds.), *Microbial Safety of Minimally Processed Foods* (pp. 221-253). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Sessa, M., Ferrara, G. & Donsì, F. (2015). Novel Edible Coating Containing Essential Oil Nanoemulsions to Prolong the Shelf Life of Vegetable Products. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 55-60.
- Souza, L.I., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., Trajano, V.N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18, 409-413.
- Szabo, E.A., Scurrah, K.J. & Burrows, J.M. (2000). Survey for Psychrotrophic Bacterial Pathogens in Minimally Processed Lettuce. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 456-460.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., Huang, B., He, J. & Wang, Y. (2011). In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control*, 22, 1992-1999.
- Uçak, I., Ozogul, Y. & Durmus, M. (2011). The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the quality changes of Atlantic mackerel fish burgers. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1157–1163.
- Vasudeva, P. & Vasudeva, N. (2015). *Origanum majorama* L-Phyto-pharmacological review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6, 261-267.

## CAPÍTULO 4:

Preliminary Study on the Effect of Fermented Cheese Whey on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Goldcoast Populations Inoculated onto Fresh Organic Lettuce

Maria I.S. Santos,<sup>1-4</sup> Ana I. Lima,<sup>4</sup> Sara A.V.S. Monteiro,<sup>4</sup> Ricardo M.S.B. Ferreira,<sup>4</sup> Laurentina Pedroso,<sup>3</sup> Isabel Sousa,<sup>2</sup> and Maria A.S.S. Ferreira<sup>1\*</sup>

Artigo publicado na Revista: **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASES: Volume 13, Number 8, 2016 DOI: 10.1089/fpd.2015.2079**

Este trabalho, ainda *in press*, despertou a atenção do editor americano, Doug Ohlemeier, que questionou a *corresponding author* para escrever um pequeno artigo de divulgação intitulado **Study: cheese whey works as well as chlorine for lettuce disinfectant** num jornal do sector dos produtos hortofrutícolas **The Packer**, o qual pode ser visto em: <http://www.thepacker.com/news/study-cheese-whey-works-well-chlorine-lettuce-disinfectant>

Alguns resultados constantes neste capítulo foram apresentados em:

Santos, M. I. S., Lima, A. I. G., Pintado, C.M.B.S., Monteiro, S. A V. S., Ferreira, R. M. S. B., Pedroso, L., Sousa, I. and Ferreira, M. A. S. S. (2013). Antimicrobial peptides produced by whey fermentation, International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL XVIII), Book of Abstracts, pág, 227, 19-22 de setembro, Goa, India.

**Preliminary Study on the Effect of Fermented Cheese Whey on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Goldcoast Populations Inoculated onto Fresh Organic Lettuce**

Maria I.S. Santos,<sup>1-4</sup> Ana I. Lima,<sup>4</sup> Sara A.V.S. Monteiro,<sup>4</sup> Ricardo M.S.B. Ferreira,<sup>4</sup> Laurentina Pedroso,<sup>3</sup> Isabel Sousa,<sup>2</sup> and Maria A.S.S. Ferreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microbiology Laboratory, Department of Natural Resources, Environment and Territory, DRAT, LEAF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.

<sup>2</sup>Eco-Processing of Food and Feed, CEE, LEAF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.

<sup>3</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Lusofona de Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal.

<sup>4</sup>Disease & Stress Biology, DRAT, LEAF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.

Running title: Effect of fermented cheese whey on pathogens inoculated on fresh organic lettuce.

\*Corresponding author: +351 21 365 3415, massferreira@isa.ulisboa.pt

## Abstract

Cheese whey fermented by an industrial starter consortium of lactic acid bacteria was evaluated for its antibacterial capacity to control a selection of pathogenic bacteria. For their relevance on outbreak reports related to vegetable consumption, this selection included *Listeria monocytogenes*, serotype 4b, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Goldcoast. Organically grown lettuce was inoculated with an inoculum level of  $\sim 10^7$  colonyforming unit (CFU)/mL and was left for about 1 h in a safety cabinet before washing with a perceptual solution of 75:25 (v/v) fermented whey in water, for 1 and 10 min. Cells of pathogens recovered were then counted and their number compared with that obtained for a similar treatment, but using a chlorine solution at 110 ppm.

Results show that both treatments, either with chlorine or fermented whey, were able to significantly reduce ( $p < 0.05$ ) the number of bacteria, in a range of 1.15–2.00 and 1.59–2.34 CFU/g, respectively, regarding the bacteria tested. Results suggest that the use of fermented whey may be as effective as the solution of chlorine used in industrial processes in reducing the pathogens under study (best efficacy shown for *Salmonella*), with the advantage of avoiding health risks arising from the formation of carcinogenic toxic chlorine derivatives.

## Introduction

Due to interest for healthier diets, the demand of fruits and vegetables, whole or minimally processed (MP), has been increasing over the last few years (OMAIAA, 2011; Olaimat and Holley, 2012). However, the number of outbreaks and cases of foodborne illnesses associated to the consumption of leafy vegetables has increased in the last few years, and consequently, the concern about the presence of pathogens in these foodstuffs (Sagong *et al.*, 2011; Painter *et al.*, 2013).

In fact, the contamination of vegetables reflects the microbiota of the environment where they are cultivated (Tauxe *et al.*, 1997; Holden *et al.*, 2009). In addition, mishandling of vegetables during harvest and postharvest, transportation, processing, and packaging can also turn these products into vehicles of pathogenic microorganisms (Heard, 2002). Data from the United States, in the period between 1998 and 2008, reported that fruits and vegetables accounted for 46 % of the foodborne diseases (most often caused by norovirus, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7), with leafy vegetables belonging to the largest numbers (Painter *et al.*, 2013). Europe reported, from 2008 to 2013, 215 outbreaks of food and waterborne diseases, 63 % related to salmonellosis, with 31 % linked to vegetables. The great German outbreak with 50 deaths caused by *E. coli* O104:H4 is within the last category (WHO, 2011; Gossner *et al.*, 2015). *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* are the pathogens of major concern implicated in numerous outbreaks of foodborne illnesses associated to the consumption of leafy vegetables, according to Sagong *et al.* (2011). Washing with sanitizers is normally the only step used in MP leafy vegetables, to assure the reduction in the number of pathogens and spoilage microorganisms. Chlorine has been the sanitizer more often used in industry, to ensure the safety of this food product. Meanwhile, concern about the environmental and consumers' health risk due to the formation of chlorine carcinogenic toxic derivatives, like trihalomethanes and chloramines, has led to increased research on new methodologies that simultaneously reduce pathogens and toxic chemicals (Sapers, 2003; Martin-Diana *et al.*, 2006; Martinez-Sanchez *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2009; Ölmez and Kretzschmar, 2009; Francis *et al.*, 2012). Our previous work (Santos *et al.*, 2015) used naturally fermented cheese whey, containing industrial lactic acid starter bacteria, as a sanitizer with promising results on hygiene indicator microorganism reduction. The present work was performed to evaluate if that antibacterial effect demonstrated for fermented cheese whey has the same magnitude of inhibition over the three major pathogens reported in outbreaks and linked to consumption of raw vegetables. This study was conducted to assess if the contact time of 1 and 10 min of fermented cheese whey and sodium hypochlorite solutions are equally efficient as sanitizers against these three pathogens spiked onto lettuce leaves.

## Materials and Methods

### Bacterial strains and culture preparation

Three bacterial species, found in higher frequency on raw fruits and vegetables and reported on outbreaks (SCF, 2002), were selected to be used in this work following the recommendations of the European Standard EN 1276:2009. *L. monocytogenes* NCTC 11994, serotype 4b, *Salmonella* Goldcoast NCTC 13175, and *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 were provided by the Food Microbiology Laboratory, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal. Inocula were prepared from stock cultures stored at -80 °C, transferred into 10 mL of Brain-heart Infusion (Oxoid™, Hampshire, United Kingdom) for two consecutive cultures with 24 h intervals, struck afterward on Tryptone Soya Agar with Yeast Extract (TSYEA; bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, France), and incubated at 37 °C ± 1 °C overnight. A suspension of these cultures was made in Maximum Recovery Diluent (MRD; bioMérieux SA), corresponding to ~10<sup>7</sup> colony-forming unit (CFU)/mL. Bacterial populations in these suspensions were determined by surface plating duplicate samples on Compass® *Listeria* Agar, Compass *Salmonella* Agar, and CT-SMAC (all Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for *L. monocytogenes*, *Salmonella* Goldcoast, and *E. coli* O157:H7, respectively. After serial dilution in MRD, the plates were incubated at 37 °C ± 1 °C for 24 h, after which colony counts were recorded.

### Sample inoculation

Lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*), manure fertilized grade, was purchased from a certified organic grower, at a local market. Two or three damaged outer lettuce leaves were discarded in all samples and the unspoiled ones were cut, using a metal cutter with 6 cm diameter. Samples of leaves (50 g) were spiked by immersion in 500 mL of MRD containing individually the suspensions of bacteria described above, for 1 min. Afterward, each inoculum was decanted and the lettuce placed separately on a sterile perforated tray to drain and left to dry in a biosafety cabinet at room temperature (22 °C ± 4 °C) for about 1 h.

### Preparation of washing solutions

Whey, obtained as waste from a cheese factory, fermented as previously described (Santos *et al.*, 2015) has, undiluted, a batch average of (g/L): lactic acid 18, acetic acid 0.89, ethanol 7.46, and a final pH of 3.19. A percentage solution of fermented whey in water (75:25, v/v) and a chlorine solution (110 ppm) were prepared as previously used (Santos *et al.*, 2015). Washing treatments Lettuce leaves (10 g), spiked with each one of the bacterial species, were placed into a Stomacher bag (PE; Seward Ltd., London, United Kingdom) either with: (1) no sanitizer solutions (control), (2) 50 mL of 110 ppm sodium

hypochlorite or (3) 50 mL of diluted fermented whey for 1 and 10 min of contact time. All samples were shaken at 4 °C using an incubator with orbital shaking (Panasonic MIR 154, Tokyo, Japan). We consider the initial bacterial load that was attached onto lettuce leaves, as determined for treatment of (1) our control reference, because previous studies revealed that washing with water reduced 0.5–1.0 log CFU/g (Singh *et al.*, 2002; Sagong *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015).

### Microbiological analyses

After the washing step, leaves were transferred into new sterile Stomacher bags, diluted 1:10 with Buffered Peptone Water (bioMérieux SA) and then homogenized in the Stomacher (Stomacher 400 Circulator; Seward Limited, London, United Kingdom) for 1 min at 230 rpm for bacterial evaluations. Serial dilutions of the initial suspensions were made in MRD and then surface plated in duplicate (0.1 mL) onto Compass *Listeria* Agar, Compass *Salmonella* Agar, and CT-SMAC, with incubation at 37 °C ± 1 °C for 24 ± 2 h. To assure that only the spiked bacteria were recovered and compared with the initial load, representative colonies were picked up to TSYE for confirmation and, subsequently, inoculated into API *Listeria* (bioMérieux SA), Triple Sugar Iron, and Indole test (both Biogerm, Maia, Portugal), for *L. monocytogenes*, *Salmonella* Goldcoast, and *E. coli* O157:H7, respectively, for biochemical identification.

### Statistical analysis

Counts were statistically analyzed using the software SigmaPlot (version 12.5) from StatSoft (Tulsa, OK), to perform a two-way analysis of variance with a Tukey's test to compare differences between groups at  $p < 0.05$ .

### Results and Discussion

Fresh organic lettuce leaves inoculated with *L. monocytogenes*, serotype 4b, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Goldcoast were used to assess the effect of fermented cheese whey on the reduction of bacterial cell numbers. Immediately after inoculation, lettuce samples used as control, presented initial populations of *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, and *Salmonella* Goldcoast of 6.34, 5.61, and 5.99 log CFU/g, respectively. The reductions obtained after 1 and 10 min contact time with the sanitizer solutions assayed are presented in Table 1. As a general note, results show that both chlorine and fermented whey treatments were able to significantly reduce ( $p < 0.05$ ) the level of all bacteria tested, compared to the numbers of bacterial cells present in the controls. However, the efficacy of the chlorine and whey treatments varied with the characteristics of the bacterial species under test.



Table 1. Populations of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Goldcoast Recovered from Lettuce Leaves Following Treatments

Contact Time (minutes)	Assays	Strains					
		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Escherichia coli</i> O157:H7		<i>Salmonella</i> Goldcoast	
		Population recovered (log cfu g <sup>-1</sup> )	Reduction (log cfu g <sup>-1</sup> )	Population recovered (log cfu g <sup>-1</sup> )	Reduction (log cfu g <sup>-1</sup> )	Population recovered (log cfu g <sup>-1</sup> )	Reduction (log cfu g <sup>-1</sup> )
	Treatments						
	Initial cell load	6.34±0.20 <sup>a</sup>	-	5.61±0.09 <sup>a</sup>	-	5.99±0.06 <sup>a</sup>	-
1	Chlorine solution (100 ppm)	4.22±0.10 <sup>b</sup>	1.59±0.14	2.68±0.10 <sup>b</sup>	2.20±0.02	3.34±0.07 <sup>b</sup>	1.99±0.13
	Fermented whey (75:25 v/v)	4.80±0.09 <sup>c</sup>	1.15±0.20	2.97±0.06 <sup>b</sup>	1.98±0.04	4.11±0.14 <sup>d</sup>	1.41±0.11
10	Initial cell load	6.34±0.20 <sup>a</sup>	-	5.61±0.09 <sup>a</sup>	-	5.99±0.06 <sup>a</sup>	-
	Chlorine solution (100 ppm)	3.91±0.33 <sup>b</sup>	1.77±0.16	2.80±0.72 <sup>b</sup>	2.12±0.64	2.86±0.14 <sup>c</sup>	2.34±0.19
	Fermented whey (75:25 v/v)	4.62±0.36 <sup>c</sup>	1.23±0.44	3.11±0.57 <sup>b</sup>	1.89±0.49	3.32±0.24 <sup>e</sup>	2.00±0.25

\*Values are means ± standard deviation of duplicates of three independent trials. Different letters represent significant differences between values (P<0.05).

With respect to the contact times studied, 1 and 10 min with chlorine or whey as sanitizers, the results show that no significant reduction ( $p > 0.05$ ) was observed on numbers of *L. monocytogenes* by increasing the length of time. Gram positive bacterial cells are more permeable to molecules in general, due to their content in peptidoglycan and absence of lipopolysaccharide of membranes.

However, for each contact time, significant differences were found in *L. monocytogenes* cell numbers between both sanitizers and the control, with chlorine producing slightly better results. Chlorine is forbidden as sanitizer of MP vegetables, in Germany, The Netherlands, Switzerland, and Belgium, for consumer health risk, due to formation of toxic compounds (Rico *et al.*, 2007).

The results obtained for reduction in numbers of log CFU/g of *Salmonella* Goldcoast were essentially identical on the capacity of chlorine and fermented whey to remove *Salmonella* Goldcoast and *L. monocytogenes* cells from lettuce leaves. A significant difference in number reductions between both treatments, compared to the initial cell load used ( $p < 0.05$ ), showed that chlorine was able to induce a higher reduction in bacterial counts and that the time of contact of both sanitizers is relevant.

Despite the fact that *E. coli* and *Salmonella* are both Gram-negative pathogens and belong to the same *Enterobacteriaceae* family, the effect of the sanitizers tested and the two times assayed as treatments produced different results.

Overall, it is possible to conclude that the duration of treatments (1 or 10 min) did not produce a dramatic difference in cell count numbers for the three bacterial species under analysis. Nevertheless, small differences were (i.e., 1min) contact times originating better results in the case of *E. coli* O157:H7.

In a treatment with lactic acid at 2 % (w/v; a concentration higher than that used in the present study; the whey used in our experiments contained 1.4 % w/v lactic acid), Sagong *et al.* (2011) found a reduction of  $1.74 \pm 0.38$ ,  $1.73 \pm 0.16$ , and  $1.30 \pm 0.11$  for *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *L. monocytogenes*, respectively, very similar to the reductions in numbers of log CFU/g we found in this work for equivalent bacterial species.

Many works have been published with alternative methods for vegetable disinfection, such as deionizer water (Beuchat, 1998; Singh *et al.*, 2002; Rodgers *et al.*, 2004; Ölmez and Akbas, 2009), hydrogen peroxide (Lin *et al.*, 2000; Samadi *et al.*, 2009), organic acids (Beuchat *et al.*, 2004; Bari, *et al.*, 2005; Martinez-Sanchez *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009), and irradiation (Minter and Foley, 2006; Sagong *et al.*, 2011). As far as we are aware, solutions of whey fermented by lactic acid bacteria (LAB) have never been assayed before. LAB have been used traditionally for food preservation in dairy and meat products, as well as in fermented vegetables. The antimicrobial activity exhibited by LAB fermented whey may be explained by a set of characteristics, such as production of organic acids, mainly lactic acid, bioactive peptides, and hydrogen peroxide (Trias *et al.*, 2008).

In conclusion, we can say that fermented cheese whey solution has achieved a significant reduction of the lettuce leaf-inoculated population of the three pathogenic bacteria studied, with results that closely approximate those obtained with the chemical sanitizer chlorine. Fermented whey is, therefore, a promising natural product that can be a good alternative to the use of chlorine in fresh vegetable disinfection. On a previous work, no color or change on general aspect of leaves was recorded (Santos *et al.*, 2015). Because no extra washing is needed after treatments, one may add that fermented whey contains about  $10^6$  CFU/g live natural LAB (Santos *et al.*, 2015), known to have a beneficial modulating effect on the gut microbiota and to favor human health (Prakash *et al.*, 2011).

This was a preliminary study with important outcomes, which open novel cost-effective and health promoting perspectives in the disinfection of MP salads, using fermented whey, but being a preliminary result, further work should be done to test additional strains of each bacteria used, as well as other pathogenic bacteria and different exposure times.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the following institutions: Food Microbiology Laboratory of Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal, for providing the strains used in this work; and Sara Bernardes Silva, Technical Director of Indústria de Laticínios SA, Portugal, for kindly providing the whey used in this work.

## References

- Bari ML, Ukuku DO, Kawasaki R, Inatsu Y, Isshiki K, Kawamoto S. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *J Food Prot* 2005; 68: 1381-1387.
- Beuchat LR. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw. *Food Safety Issues*, WHO/FSF/FOS/98.2, Food Safety Unit, World Health Organization, Geneva. 1998. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO\\_FSF\\_FOS\\_98.2.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO_FSF_FOS_98.2.pdf?ua=1), accessed February 22, 2015.
- Beuchat LR, Adler BB, Lang MM. Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *listeria monocytogenes* on iceberg and romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *J Food Prot* 2004; 67: 1238-1242.
- European Committee for Standardization. European Standard EN 1276:2009. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements (phase 2 step 1).
- Francis GA, Gallone A, Nychas GJ, Sofos JN, Colelli G, Amodio ML, Spano G. Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012; 52: 595-610.
- Gil MI, Selma MV, López-Gálvez F, Allende A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *Int J Food Microbiol* 2009; 134: 37-45.
- Gossner C M, de Jong B, Hoebe C.J, Coulombier D. Event-based surveillance of food- and waterborne diseases in Europe: Urgent inquiries (outbreak alerts) during 2008 to 2013. *Eurosurveillance* 2015; 20: 1-7.
- Heard GM. Microbiology of Fresh-Cut Produce. In: *Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market*. Lamikanra O (ed.). Boca Raton: CRC Press, 2002, pp. 187-248.
- Holden N, Pritchard L, Toth I. Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33: 689-703.
- Lin C, Moon SS, Doyle MP, McWatters KH. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteric* Serotype Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on Lettuce by Hydrogen Peroxide and Lactic Acid and by Hydrogen Peroxide with Mild Heat. *J Food Prot* 2002; 65: 1215-20.

- Martin-Diana A, Rico D, Frias J, Mulcahy J. Whey permeate as a bio-preservative for shelf life maintenance. *Innovative Food Sci Emerging Technol* 2006; 7: 112 – 123.
- Martinez-Sanchez A, Allende A, Bennett RN, Ferreres F, Gil MI. Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biol Technol* 2006; 42: 86-97.
- Minter AM, Foley DM. Electron Beam and Gamma Irradiation Effectively reduce *Listeria monocytogenes* populations on chopped romaine lettuce. *J Food Prot* 2006; 69: 570-74.
- Olaimat AN, Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol* 2012; 32: 1-19.
- Ölmez H, Akbas MY. Optimization of ozone treatment of fresh-cut green leaf lettuce. *J Food Eng* 2009; 90: 487-94.
- Ölmez H, Kretzschmar U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT--Food Sci Technol* 2009; 42: 686-693.
- [OMAIAA] Observatório dos Mercados Agrícolas e Importações Agro-Alimentares. O mercado da alface em Portugal, 2011. Available at: [http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id\\_item=133](http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=133), accessed February 22, 2015.
- Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, Tauxe RV, Braden CR, Angulo FJ, Griffin PM. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerging Infect Dis* 2013; 19: 407-415.
- Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biol.: Targets Ther* 2011; 5: 71–86.
- Rico D, Martín-Diana A, Barat J, Barry-Ryan C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends Food Sci Technol* 2007; 18: 373-386.
- Rodgers ST, Cash JN, Siddiq M, Ryser ET. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *J Food Prot* 2004; 67: 721-31.
- Sagong H, Lee S, Chang P, Heu S, Ryu S, Choi Y, Dong-Hyun Kang. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *Int. J. Food Microbiol* 2011; 145: 287-292.

Samadi N, Abadian N, Bakhtiari D, Fazeli MR, Jamalifar H. Efficacy of detergents and fresh produce disinfectants against microorganisms associated with mixed raw vegetables. *J Food Prot* 2009; 72: 1486-1490.

Santos MIS, Martins SR, Pedroso L, Sousa I, Ferreira MASS. Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce. *Food Control* 2015; 50: 477-481.

Sapers GM. Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruits and vegetables. In: *Microbial Safety of Minimally Processed Foods* Novak JS, Sapers GM, and Juneja VK (eds.). Boca Raton: CRC Press, 2003, pp. 221-253.

SCF. Risk profile on the microbiology contamination of fruits and vegetables eaten raw. Report of the Scientific Commission on Food, European Commission on Health and Consumer Protection Directorate-General, 2002.

Singh N, Singh RK, Bhunia AK, Stroshine RL. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *Food Microbiol* 2002; 19: 183-193.

Tauxe R, Kruse H, Hedberg C, Potter M, Madden J, Wachsmuth K. Microbiological hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *J Food Prot* 1997; 60: 1400-1408.

Trias R, Bañeras L, Badosa E, Montesinos E. Bioprotection of golden delicious apples and iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 2008; 123: 50-60.

WHO. Outbreaks of *E. coli* O104:H4 infection: update 30. Available at: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/food-safety/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30>, accessed June 26, 2015.

Zhang G, Ma L, Phelan VH, Doyle, MP. Efficacy of antimicrobial agents in lettuce leaf processing water for control of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* 2009; 72: 1392-1397.

## CAPÍTULO 5:

Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce

M. I. S. Santos<sup>1,2,3</sup>, S.R. Martins<sup>1,2</sup>, L. Pedroso<sup>3</sup>, I. Sousa <sup>2</sup> and M. A. S. S. Ferreira <sup>1\*</sup>

Artigo publicado na Revista: **FOOD CONTROL: Volume 50 (2015) 477-481**  
*doi:10.1016/j.foodcont.2014.09.032*

Alguns resultados constantes neste capítulo foram apresentados em:

M.I.S. Santos, C.M.B.S. Pintado, S.R.C. Martins, A.C.S. Cação, L. Pedroso, I. Sousa and M.A.S.S.Ferreira (2012). Evaluation of potential use of cheese whey fermented extracts in food safety. 2nd International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2012, Book of Abstracts, pg. 21, 21-23 November, Lisbon, Portugal

## **Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce**

M. I. S. Santos<sup>1,2,3</sup>, S.R. Martins<sup>1,2</sup>, L. Pedroso<sup>3</sup>, I. Sousa<sup>2</sup> and M. A. S. S. Ferreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Microbiology Laboratory, Centro de Botânica Aplicado à Agricultura , CBAA, DRAT and <sup>2</sup>Eco-processing of Food and Feed, CEER, DCEB, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 1349-017 Lisbon, Portugal

<sup>3</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisbon, Portugal

Running title: Sanitation with whey fermented extracts

Key words: Whey; Lactic acid; Lettuce; Hygiene; Sanitizers

\*Corresponding author: +351 21 365 3415, massferreira@isa.ulisboa.pt

## Abstract

Consumption of vegetables is increasing due to demand for healthy products in peoples' diets. To reduce microbial contamination and maintain freshness, industrial processes rely on minimally processing of vegetables with hypochlorite as sanitizer. Formation of toxic chlorine derivatives has raised concern restrictions to its use and alternatives with whey permeate as a disinfection agent has been attempted. The aim of this work was to evaluate the bio potential of fermented cheese whey, for use on disinfection of minimally processed lettuce organically grown.

Assays were made with whey fermented for 120 h at 37 °C, after which, among other carbohydrates, lactic acid was measured by HPLC, giving average yields of 18 g L<sup>-1</sup>.

The sanitizing effect of whey, undiluted, 75 and 50 % solutions was compared with sodium hypochlorite, 100 ppm, using Aerobic Microorganisms (AM), Psychrotrophic Microorganisms (PM) and *Enterobacteriaceae* (ENT), as indicators for hygiene quality. The study was kept for 7 days of shelf life, after which the hygiene quality standards of lettuce samples, were better using 75 % whey solution (AM 6,62, PM 7,48 cfu g<sup>-1</sup>), than using sodium hypochlorite (AM 7,48, PM 8,15 cfu g<sup>-1</sup>), for a level of significance of P<0,05. Evaluation of *Enterobacteriaceae* showed significant differences after 3 days, between water (ENT 4,98 cfu. g<sup>-1</sup>) sodium hypochlorite (ENT 4,81 cfu. g<sup>-1</sup>) and 75 % solution of whey (ENT 4,63 cfu. g<sup>-1</sup>).

Considering the actual limitations imposed to chlorine sanitation, these results point a good alternative to the food industry, especially for organic fresh vegetables, which are chemical free brands.

Keywords: Whey, lactic acid, lettuce, hygiene, antimicrobials



## 1. Introduction

The variety of minimally processed (MP) produce, available at retail markets, reflects the increasing demand of consumers for healthy products (James & Ngarmsak, 2010). They are a low fat and low energy food source of vitamins, minerals, fibre, and antioxidants. Scientific evidences suggested that its consumption helps prevent a range of diseases, which includes coronary heart disease, type II diabetes and several cancers. These facts led the World Health Organization (WHO), as well as many health authorities of several countries, to stimulate the consumption of vegetables and fruits in the order of 400 g per day (Ruiz-Cruz & Arvizu-Medrano, 2010; WHO, 2013).

Consequently, the food industry has responded to this demand with creative product development, new production practices and innovative use of technology (Artés, Gómez & Artés-Hernandez, 2007).

MP produce may be defined as any vegetable or fruit in the fresh state that has been physically altered from its original form and then packed, but remains in a fresh state and ready to use (Gómez-López, Ragert, Debever & Dvlieghere, 2008).

Once vegetables are raw products of agricultural origin, are expected to contain microorganisms, including pathogens and minimal processing may increase the likelihood of microbial growth due to: 1) increase surface exposure, 2) release tissue intracellular content, 3) no assurance of sterility, 4) metabolism stability of plant tissue and finally 5) atmosphere confine packaging (Nguyen-the & Carlin, 2000).

Recent reports on levels of AM and/or PM and ENT give orders of  $10^4 - 10^8$  and  $10^3 - 10^7$  cfu g<sup>-1</sup> respectively (Fröder, Martins, Souza, Landgraf, Franco & Destro, 2007; Abadias, Usall, Anguera, Solsona & Viñas, 2008; Santos *et al.*, 2012 ). Although it does not indicate faecal contamination it can compromises sensorial and nutritive quality (Santos *et al.*, 2012).

Guidelines for ready to eat (RTE) fresh or MP fruits and vegetables, generally specify as steps: 1) washing to remove dirt, pesticide residues and microorganisms and 2) sanitizing, usually with sodium hypochlorite (Brackett, 1987; Beuchat & Ryu, 1997; Beuchat, 1998). Concern on formation of toxic derivatives, trihalomethanes and chloramine, harmful to human health has risen restrictions to use (Sapers, 2003; Martinez-Sanchez, Allende, Bennett, Ferreres & Gil, 2006). Although it has been emerging an increasing number of alternative methods, no one has acquired widespread acceptance by the industry (Martín-Diana *et al.*, 2006). Therefore, new trends in food safety and sanitation, advise the use of natural products and consequently, assays on new preservative methods, effective on microbial growth reduction along storage, are important targets (Santos *et al.*, 2012).

Increasing attention has been given to studies on use of whey permeate (WP) as a disinfection agent in vegetables and a significant antimicrobial effect of solutions was observed and no adverse effects

on the sensory characteristics on trout was reported (Nykänen, Lapveteläinen, Kallio & Salminen, 1998; Martin-Diana, *et al.*, 2006).

The aim of this work was to evaluate the bio potential of naturally fermented cheese whey, containing industrial lactic acid starter bacteria, for its use as an antimicrobial agent solution, on disinfection of minimally processed lettuce purchased to organic growers.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Characterization of whey

#### 2.1.1 Samples

Samples of whey obtained by manufacture of cheese from mixed ewe, goat and cow's milk inoculated with a bacterial starter mix (Danisco, Sassenage, France) of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, were collected at four different times during the season and kept at -18 °C for analyses and assays whenever necessary.

#### 2.1.2. Chemical analyses

The amount of sugars and acids present at the beginning, during and at the end of the fermentation assays were quantified through Ionic exchange in a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) System (Waters Corporation, Milford, MA, USA), equipped with a 515 HPLC Pump, Waters Corporation, Milford, MA and incorporated with a Refractive Index Detector (RID) (486 Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Prior to injection, samples were centrifuged at 10.000 rpm (Eppendorf 5414D, Hamburg, Germany) for 10 min and the supernatants were filtered through a Millipore membrane with a pore size of 0.2 µm. Samples were injected in a Schodex SC-1011 column (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and separations were achieved at 50 °C, using 5 mM Sulphuric acid as mobile phase (isocratic elution), at a flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup>. Calibration curves were made with standard solutions (in 5 mM sulphuric acid) of lactose (Sigma-Aldrich, Netherlands) 30 g L<sup>-1</sup>, glucose (Panreac, Barcelona, Spain) 10 g L<sup>-1</sup>, galactose (Sigma-Aldrich, Netherlands) 15 g L<sup>-1</sup>, lactic acid (Sigma-Aldrich, Netherlands) 30 g L<sup>-1</sup>, acetic acid (Panreac, Barcelona, Spain) 5 g L<sup>-1</sup>, and ethanol (Aga, Lisboa, Portugal) 5 g L<sup>-1</sup>. Peak Integration was performed using the HPLC software Empower Pro (Waters Corporation, Milford, MA, USA). The Portuguese Norm NP-471 (1983) was used for chloride ions measurements.

### 2.1.3. Bacteriological and mycological analyses

Samples were evaluated for presence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* using ISO 6579:2002, ISO 11290-1:1996, Amd. 1: 2004 and ISO 16649-2:2001 standards respectively. For detection and enumeration of yeasts spreading of 0,1 mL samples were also made onto duplicate plates of Glucose Yeast Peptone Agar (GYP) 0,5 % (w/v) of yeast extract (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), 0,5 % (w/v) of peptone (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), 2 % (w/v) of glucose (Copam, Portugal) and 2 % (w/v) of agar (Dário Correia, Portugal) incubated at 25 °C for 10 days.

### 2.2. Lettuce variety

Lettuce (*Lactuca sativa*) was always purchased to the same organically grower, at a local market, the day before the assays and kept under refrigeration at 4 °C until use.

### 2.3. Assays of whey fermentation

Diluted portions of whey to achieve the final concentration of lactose of 30 g L<sup>-1</sup> were divided into aliquots of 500 mL, distributed into Erlenmeyer flasks and placed into an incubator at 37 °C. Along time, at regular intervals, 5 mL samples were taken for pH measurement (Lab 850, Schott AG, Mainz, Germany) and HPLC determinations. Two equal consecutive pH measurements were considered as indication of the end of the fermentation process, which has occurred after 120 h. At this time, fermented samples were divided into smaller portions and frozen at -18 °C and kept until necessary. Assays were repeated in three independent trials.

### 2.4. Preparation of sanitizer solutions

Whey fermented extract solutions at 100, 75 and 50 % in water, were used for sanitation assays and compared with a chlorine solution of 110 ppm made dissolving Amokina® (Angelini, Portugal) in sterile water, according to manufacturer instructions. All solutions were made the day before use and kept under refrigeration at 4 °C.

### 2.5. Sanitation procedure

Two or three outer leaves were discarded in all samples and the internal leaves of lettuce were taken and placed on a sterilized bench surface. Representative portions of all parts were taken, using a metal cutter with 6 cm diameter and soaked in sterilized distilled water for 10 min and kept in a cold room. After this time, samples were transferred into five plastic bags, weighted in 10 g portions and sanitized in 200 mL of the four sanitizing solution previously prepared. The fifth portion was just soaked in sterile water and served as reference. All bags clamped and identified with the sanitizer solution under study, were stirred for 10 min at 4 °C using an incubator with orbital shaking (Panasonic MIR 154, Japan). At

the end of this time, bags were opened and samples rinsed into sterile distilled water to remove sanitizers, placed into heat sealed bags and kept at 4 °C for 1, 3, 5 and 7 days, for microbiological determinations and evaluation of shelf life condition.

## 2.6. Evaluation of the effect of sanitizers

At 1, 3, 5 and 7 days intervals, bags were opened and samples transferred aseptically to sterile bags (Baglith, PolySilk®, 400 mL, Intercience, Saint Nom, France) diluted with 90 mL of sterile Ringer solution (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), homogenized (Mastigator 400, IUL, Barcelona, Spain) for 90 sec and decimal dilutions were prepared, according to standard ISO 6887-1:1999. The effect of sanitizers was determined by comparing reductions on AM at 30 °C, (ISO 4833: 2003), PM, (ISO 17410: 2001), ENT, (ISO 21528-2: 2004). Lactic Acid Bacteria (LAB) were also enumerated by pour plating in MRS agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) and incubated at 37 °C for 24 h.

All bacterial counts of colony forming units (cfu) were made using duplicate plates.

Counts were statistically analysed using the software Statistica™ v10 from Statsoft, USA, to perform an ANOVA with a Tukey test with  $\alpha=0,05$ .

## 3. Results and discussion

Results from the microbiological analyses of whey, before fermentation assays, detected about  $3,0 \times 10^2$  yeasts cfu mL<sup>-1</sup>, but no pathogenic bacteria were found in our samples. The fermentation profile of products that was obtained by HCLP analyses is given in Table 1 and consists on metabolites, mainly due to the homo fermenters, present in the starter consortium of LAB mixture used for assays.

Lettuce that was used as food model in our work is under microbiological compliances, established by the European Regulation (EC) 2073: 2005 and its amendments, for RTE products, regarding the numbers of *Escherichia coli* and *Salmonella*. Nevertheless, to evaluate the industrial hygienic process of sanitation, other microbiological indicators have been suggested as criterions. Determinations of AM at 30 °C has been used as good quality indicator for lettuce and other RTE products (Heard, 2002) with values detected ranging from 1,84 to 8,9 cfu g<sup>-1</sup>.

Table 1. Composition of whey after 120 h fermentation at 37 °C, evaluated by HPLC

(g L <sup>-1</sup> )	Whey 1	Whey 2	Whey 3	Average*
Lactose	3,05	2,37	3,04	2,82±0,39
Galactose	2,15	3,28	3,03	2,82±0,59
Glucose	-	-	-	-
Lactic acid	17,88	18,76	18,49	18,38±0,45
Acetic acid	0,58	1,03	1,05	0,89±0,27
Ethanol	7,31	7,79	7,29	7,46±0,28

\*Dilutions of whey at 75 and 50 % contain three quarters and a half the amount of all the average carbohydrates evaluated by HPLC. Average figures are presented with standard deviation.

Evaluating sanitation of our samples by the numbers of AM present after 7 days of shelf life assayed in this work (Table 2), cell counts of samples washed with 100 % whey solution, is significantly lower ( $P < 0,005$ ) than counts obtained with sodium hypochlorite as sanitizer. Because lettuce is stored under refrigeration, PM together with ENT, were considered as well, other good indicators for a sanitation process evaluation. The last group after all, consists of 10 % of the total microbial load in RTE (Nguyen-the & Carlin, 2000). Results of our lettuce samples shows in fact that PM are the greater bacterial group present and figures in Table 3 highlights that the hygienic capacity of sodium hypochlorite against this group, was not significantly different from water, by the end of the shelf life period studied. After 24 h there are already significant reductions on ENT counts, between lettuces washed with solutions of whey and water, and in the following days, although not significantly, they are smaller (Table 5). Nevertheless, no significant differences between all sanitizing solutions and water were found on the 7th day and sodium hypochlorite showed a reduced efficiency to control these Gram negative bacteria, which is in agreement with the reports observed in industry (Kim, Park & Rhee, 2014).

Table 2. Effect of sanitation assays of lettuce on Aerobic Microorganisms at 30 °C

Day	100 % Whey	75 % Whey	50 % Whey	Sodium Hypochlorite	Water
0	6,67±0,19 <sup>b*†</sup>	6,67±0,19 <sup>ba</sup>	6,67±0,19 <sup>ba</sup>	6,67±0,19 <sup>aA</sup>	6,67±0,19 <sup>ba</sup>
1	5,03±0,16 <sup>aA</sup>	5,16±0,21 <sup>aAB</sup>	5,34 ±0,15 <sup>aB</sup>	5,76±0,11 <sup>bc</sup>	6,72±0,23 <sup>bd</sup>
3	5,37±0,18 <sup>aA</sup>	5,53 ± 0,12 <sup>aA</sup>	5,75 ± 0,47 <sup>aAB</sup>	6,14±0,34 <sup>cB</sup>	7,18±0,16 <sup>aC</sup>
5	6,05±0,27 <sup>cA</sup>	6,17±0,24 <sup>ba</sup>	6,31 ±0,14 <sup>baB</sup>	6,68±0,21 <sup>aB</sup>	7,17± 0,32 <sup>aC</sup>
7	6,49 ±0,28 <sup>ba</sup>	6,62 ± 0,34 <sup>cAB</sup>	6,80 ±0,30 <sup>cAB</sup>	7,03±0,11 <sup>dbc</sup>	7,41±0,11 <sup>aC</sup>

\* For the same column, average values with a different letter, are significantly different ( $P < 0, 05$ ) † For the same line average values with a different letter are significantly different ( $P < 0, 05$ ). Figures are log<sub>10</sub> cfu g<sup>-1</sup> average of duplicates of three independent trials.

Table 3. Effect of sanitation assays of lettuce on Psychotropic Microorganisms

Day	100 % Whey	75 % Whey	50 % Whey	Sodium Hypochlorite	Water
0	4,67±0,37 <sup>a*†</sup>	4,67±0,37 <sup>ca</sup>	4,67±0,37 <sup>ca</sup>	4,67±0,37 <sup>aA</sup>	4,67±0,37 <sup>ba</sup>
1	3,27±0,26 <sup>ba</sup>	3,44±0,35 <sup>ba</sup>	3,50±0,33 <sup>ba</sup>	3,63±0,20 <sup>ba</sup>	5,43±0,35 <sup>cb</sup>
3	5,46±0,61 <sup>cAB</sup>	5,77±0,61 <sup>aAB</sup>	6,12± 0,56 <sup>dAB</sup>	5,14±0,46 <sup>aA</sup>	7,15±0,46 <sup>dc</sup>
5	6,37±0,39 <sup>da</sup>	6,47±0,24 <sup>aAB</sup>	6,91±0,23 <sup>aBC</sup>	7,33±0,21 <sup>cc</sup>	7,98±0,35 <sup>ad</sup>
7	7,15±0,27 <sup>ea</sup>	7,48± 0,50 <sup>da</sup>	7,48±0,50 <sup>aA</sup>	8,15±0,22 <sup>db</sup>	8,48±0,22 <sup>ab</sup>

\* For the same column, average values with a different letter, are significantly different ( $P<0,05$ ) † For the same line average values with a different letter are significantly different ( $p<0,05$ ). Figures are  $\log_{10}$  cfu g<sup>-1</sup> average of duplicates of three independent trials.

The sanitizing effect of whey in comparisons with sodium hypochlorite, over AM (Table 2), PM (Table 3) and ENT (Table 5) populations present, shows that along the 7 days of shelf life studied, the three solutions made out of whey, undiluted, 75 and 50 % solutions, gave better or equivalent reductions on all  $\log_{10}$  numbers of bacterial indicators used. The microbiological hygiene quality achieved using sodium hypochlorite, which is in used in most industrial premises, were no better than the ones presented by samples sanitized by 75 % whey solution. This fact may be due to the antibiotic potential of fermented whey, which beside lactic acid has a low pH and as well might have bacteriocins and other bioactive peptides (Nykänen *et al.*, 1998). The solutions of whey used in this work, have a content in lactic acid approximately of 1,8, 1,35 and 0,9 % (w/v) for concentrations of 100 (undiluted), 75 and 50 % respectively, an average pH of 3,19 (undiluted) and acetic acid and ethanol as well (Table 1). Work done previously in our laboratory, with organic acids on agar diffusion plates, demonstrated that water solutions of 1,5 and 3 % (w/v) of lactic acid, pH 3,34 and 2,92 respectively, has a good antimicrobial effect against pathogenic Gram positive bacteria (Pintado, Ferreira & Sousa, 2009).

Regarding stability of lettuce, the presence of live LAB, from the starter mix used to ferment whey extracts, could increase these bacteria to levels of concern, for its future purpose as sanitizer, because vegetables were considered unsatisfactory if more than 8  $\log_{10}$  cfu g<sup>-1</sup> were present (HPA 2009). Evaluations presented on Table 4 showed that LAB are naturally present on lettuce leaves, because cell counts on samples just washed in water, ranged from 3,95 to 5,48  $\log_{10}$  cfu g<sup>-1</sup> and no significant increase was caused along 7 days of shelf life, despite the fact of have been soaked in 200 mL of 75 % whey solution. Therefore, the use of solutions of fermented extracts of whey has proven a good bio potential to be used as sanitizer.

Table 4. Effect of sanitation assays of lettuce on Lactic Acid Bacteria

Day	100 % Whey	75 % Whey	50 % Whey	Sodium Hypochlorite	Water
0	3,95±0,31 <sup>c*A†</sup>	3,95±0,31 <sup>bA</sup>	3,95±0,31 <sup>aA</sup>	3,95±0,31 <sup>aA</sup>	3,95±0,31 <sup>aA</sup>
1	4,62±0,28 <sup>aA</sup>	4,48±0,30 <sup>cA</sup>	4,36 ±0,31 <sup>abA</sup>	3,50±0,26 <sup>abB</sup>	4,39±0,37 <sup>abA</sup>
3	5,04±0,10 <sup>abA</sup>	4,91±0,19 <sup>aA</sup>	4,91±0,12 <sup>bcAC</sup>	4,15±0,23 <sup>bB</sup>	4,51±0,39 <sup>abBC</sup>
5	5,21±0,13 <sup>bA</sup>	5,05±0,21 <sup>aA</sup>	5,21±0,34 <sup>cdA</sup>	4,99±0,33 <sup>cA</sup>	4,79±0,40 <sup>bA</sup>
7	5,66±0,35 <sup>dB</sup>	5,53± 0,22 <sup>dAB</sup>	5,53 ±0,29 <sup>dAB</sup>	5,12±0,28 <sup>cA</sup>	5,48±0,30 <sup>cAB</sup>

\* For the same column, average values with a different letter, are significantly different (P<0, 05) † For the same line average values with a different letter are significantly different (P<0, 05). Figures are log<sub>10</sub> cfu g<sup>-1</sup> average of duplicates of three independent trials.

Considering the actual limitations imposed to chlorine use (Martinez-Sanchez *et al.*, 2006) in the food industry, due to authorities restrictions and consumers health awareness, these results point a good alternative to chlorine sanitation, especially for organic fresh vegetables, which have a brand claim as chemicals free.

Table 5. Effect of sanitation assays of lettuce on *Enterobacteriaceae*

Day	100 %Whey	75 %Whey	50 % Whey	Sodium Hypochlorite	Water
0	5,23±0,14 <sup>ab*A†</sup>	5,23±0,14 <sup>abA</sup>	5,23±0,14 <sup>abA</sup>	5,23±0,14 <sup>abA</sup>	5,23±0,14 <sup>abA</sup>
1	3,76±0,17 <sup>cA</sup>	3,84±0,22 <sup>cA</sup>	3,91±0,20 <sup>cA</sup>	4,19±0,35 <sup>cA</sup>	4,82±0,52 <sup>abB</sup>
3	4,49±0,22 <sup>dA</sup>	4,63±0,19 <sup>dAB</sup>	4,63±0,25 <sup>dA</sup>	4,81±0,30 <sup>aAB</sup>	4,98±0,31 <sup>abBC</sup>
5	5,01±0,19 <sup>aAB</sup>	5,13±0,22 <sup>aAB</sup>	4,95±0,25 <sup>aA</sup>	5,06±0,34 <sup>abAB</sup>	5,54±0,50 <sup>bcB</sup>
7	5,45±0,25 <sup>bA</sup>	5,52± 0,31 <sup>bA</sup>	5,43 ±0,21 <sup>bA</sup>	5,47±0,46 <sup>bA</sup>	5,79±0,47 <sup>cA</sup>

\* For the same column, average values with a different letter, are significantly different (P<0, 05) † For the same line average values with a different letter are significantly different (P<0, 05). Figures are log<sub>10</sub> cfu g<sup>-1</sup> average of duplicates of three independent trials.

## Acknowledgments

Authors would like to acknowledge Ricardo Chagas of Disease & Stress Biology and Ana Carla Silva from the Microbiology Laboratory for technical assistance. We are very grateful to Sara Bernardes Silva, Technical Director of Indústria de Laticínios, S.A., for providing the whey samples used in this work.

#### 4. References

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C. & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* 123 (1-2), 121-129.
- Artés, F., Gómez, P.A. & Artés-Hernandez, F. (2007). Physical, physiological and microbial deterioration of minimally fresh processed fruits and vegetables. *Food Science Technology International*, 13 (3), 177-188.
- Beuchat, L.R. (1998). Surface Decontamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw. *Food Safety Issues*, World Health Organization, Geneva, WHO/FSF/FOS/98.2 (assessed on 22/02/2014)  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/surfac\\_decon/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/surfac_decon/en/)
- Beuchat, L.R. & Ryu, J.H. (1997). Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases*, 3 (4), 458-465.
- Brackett, R.E. (1987). Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 50 (12), 999-1003.
- Comission Regulation (EC) Nº 2073 (2005) of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal*, L338-1, Brussels.
- Gómez-López, V., Ragert, P., Debevere, J. & Dvlieghere, F., (2008). Descontaminantion methods to prolong the shelf-life of minimally processed vegetables, State-of-the-art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48 (6), 487-495.
- Heard, G. (2002). Microbiology of Fresh-Cut Produce. In Lamikanra, O (Ed.). *Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market* (pp. 187-248). Boca Raton, EUA: CRC Press.
- Heath Protection Agency (2009). Guidelines for Assesing the Microbiology Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market. London: Heath Protection Agency.
- ISO 4833 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 °C. Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 21528-2 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count method. Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.



ISO 11290-2 (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. AMENDMENT 1 (2004). Modification of the Isolation Media and the Haemolysis Test, and Inclusion of Precision Data. Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.

ISO 6887-1 (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.

ISO 16649-2 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronidase. Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.

ISO 17410 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms. Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.

ISO 6579 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.

James, J.B. & Ngarmasak, T. (2010). *Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: A technical guide*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Regional Office for Asia and the Pacific, RAP PUBLICATION 2010/16.

Kim, N. H., Park, T. H. & Rhee, M.S. (2014). Enhanced bacterial action of acidified sodium chlorite caused by the saturation of reactants. Accepted Article DOI 10.1111/jam.12484.

Martin-Diana, A., Rico, D., Frias, J., Mulcahy, J., Henahan, G. & Barry-Ryan, C. (2006). Whey permeate as a bio-preservative for shelf life maintenance. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7 (1-2), 112 – 123.

Martinez-Sanchez, A., Allende, A., Bennett, R.N., Ferreres, F. & Gil, M.I. (2006). Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biology and Technology*, 42 (1), 86-97.

Nguyen-the, C. & Carlin, F., (2000). Fresh and processed vegetables. In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker & G.W. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 620-684). Gathersburg, USA: Aspen Publication.

NP 471 (1983). Determinação do teor de cloretos em leites. Caparica: Instituto Português da Qualidade.

Nykänen, A., Lapveteläinen, A., Kallio, H. & Salminen, S., (1998). Effects of whey, whey-derived lactic acid and sodium lactate on the surface microbial counts of rainbow trout packed in vacuum pouches. *LWT - Food Science and Technology*, 31(4). 361–365.

Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S & Sousa, I. (2009). Properties of whey-protein based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 72 (9), 1891-1896.

Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A., Marchant, R. & Banat, I.M. (2008). Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technology*, 99, 5951–5955.

Ruiz-Cruz, S. & Arvizu-Medrano, S. (2010). Quality loss of fruits and vegetables induced by microbial growth. In L.A. de la Rosa, E. Alvarez-Parrilla & G. A. Gonzalez-Aguilar (Eds.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability* (pp. 341-355). Oxford, UK:Blakwell Publishing.

Santos, M.I., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M.R., Nogueira, P.J., Pedroso, L. & Ferreira, M.A.S.SA. (2012). Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control*, 23 (1), 275-281.

Sapers, G.M. (2003). Washing and Sanitizing Raw Materials for Minimally Processed Fruits and Vegetables. In J.S. Novak, G.M. Sapers & V.K. Juneja (Eds.), *Microbial Safety of Minimally Processed Foods* (pp. 221-253). Boca Raton, USA: CRC Press.

WHO (2013). Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, Promoting fruit and vegetable consumption around the world (assessed on 6/7/2013)

<http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>

## **CAPÍTULO 6:**

Impact of a new postharvest disinfection method based on fermented cheese whey on the organoleptic profile of minimally processed lettuce

M. I. S. Santos <sup>a,c,d\*</sup>, P. Fradinho <sup>b</sup>, S.R. Martins <sup>a</sup>, A. I. G. Lima <sup>c</sup>, R. M. S. B. Ferreira <sup>c</sup>, L. Pedroso <sup>d</sup>, M. A. S. S. Ferreira <sup>a</sup>, I. Sousa <sup>b</sup>

Artigo submetido na Revista: **POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY**: Reference: **POSTEC\_2016\_248**.

**Impact of a new postharvest disinfection method based on fermented cheese whey on the organoleptic profile of minimally processed lettuce**

M. I. S. Santos <sup>a,c,d\*</sup>, P. Fradinho <sup>b</sup>, S.R. Martins <sup>a</sup>, A. I. G. Lima <sup>c</sup>, R. M. S. B. Ferreira <sup>c</sup>, L. Pedroso <sup>d</sup>, M. A. S. S. Ferreira <sup>a</sup>, I. Sousa <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Microbiology Laboratory, DRAT, LEAF (Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food), ISA (Instituto Superior de Agronomia), Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal

<sup>b</sup> Eco-Novel Food and Feed, DCEB, LEAF, ISA, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal

<sup>c</sup> Disease & Stress Biology, DRAT, LEAF, ISA, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal

<sup>d</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisbon, Portugal

Key Words: Fermented whey; Lettuce; Antimicrobial; Minimally Processed

\*Corresponding author: missantos@gmail.com

## **Abstract**

Fresh-cut processing usually involves sanitizing steps, with chlorine washing being the general choice. Due to the health harming effects of chlorine, there has been an increasing demand for alternative disinfecting agents. Fermented cheese whey has been shown to be a potential natural sanitizing agent but has been poorly tested in fresh-cut produce. Previous works in our group have developed a novel fermented cheese whey where, with a higher production of lactic acid and a concomitant reduction in protein load and improved antibacterial properties. The present work was designed to validate the use of this specific fermented cheese whey as a natural disinfecting agent in shredded lettuce, with the final goal of comparing its efficacy to chlorine. We focused on quality indexes such as texture, color and sensory perception, in parallel with microbial quantification, pH determination and  $O_2$  and  $CO_2$  throughout the length of ten days. Overall, results showed that microbial quality was better in whey solution ( $P < 0.05$ ) treatments than with chlorine. Furthermore, all the quality indicators pointed out that samples treated with whey were at least similar to those treated with chlorine. Therefore, results presented here are a contribution to corroborate that fermented whey can be regarded as an effective healthier and cost effective alternative to chlorine in food disinfection.

## **1. Introduction**

The current worldwide paradigm of searching healthier lifestyles by changing eating habits has led to a rising demand for convenient healthy foods, with high nutritional value, as well as antioxidant properties. Being a fast and reliable way to access healthy products, fresh-cut fruit and vegetables are becoming a rapidly rising sector of the horticultural industry with a concomitant high consumer demand. Indeed, the WHO (World Health Organization) recommends the daily consumption of at least five portions of fruit and vegetables (5 a Day - WHO, 2004), i.e., a minimum of 400 g of fruit and vegetables (F&V) per day. F&V should be consumed as fresh or minimally processed (MP) to preserve their nutritional and functional potential. The most important target for keeping overall quality of these food products is a decrease in microbial spoilage as these cause both decay and safety problems. However, in the process to produce MP vegetables there is no step able to eliminate 100 % of the risk associated to their consumption, therefore these products usually have a very short shelf life (Siroli et al., 2015) and are hampered by food decay and contamination. Consequently, outbreaks of foodborne diseases (FBD), due to the higher consumption of these type of food products, are increasing their impact in developed societies and alternative sanitizers and wash technologies are of paramount importance (e.g. Warriner and Namvar, 2013). Washing vegetables turned out to be a sophisticated process where dirt, pesticide residues and insects are eliminated and decay microorganisms, and also some eventual pathogenics also, are greatly reduced. However, there is no guarantee of total elimination and stabilization of the product, only the increase of safety and shelf life, being a critical step for the quality and safety of these products.

Additionally, most of these RTE vegetables are shredded into small pieces and the damaged cells are more susceptible to microbiological and biochemical decay, with intensification of respiration rates and enzymatic activity, further reducing their shelf life (Allende et al., 2006; Caponigro et al., 2010; Francis et al., 2012; Ragaert et al., 2007; Warriner and Namvar, 2013). To work around this crucial issue, the cold temperatures must be kept tightly through all the process chain, to insure their preservation (Fröder et al., 2007; Martinez-Sanchez et al., 2006; Ramos et al., 2013).

The major preservation techniques applied to prevent or delay spoilage are chilling storage and modified atmosphere packaging (MAP), combined with chemical disinfecting solutions (Leistner and Gould, 2002). Chlorine is the most common disinfectant used in the fresh-cut industry due to the low cost and simplicity of handling. However, due to environmental issues with the residual waters and strong evidences of carcinogenic problems, from the highly probable formation of toxic derivatives, like chloramines and trihalomethanes, restrictions to the use of chlorinated solutions have been arising (Francis, et al., 2012; Martin-Diana et al., 2006; Martinez-Sanchez et al., 2006; Ölmez and Kretzschmar, 2009; Sapers, 2003), as well as the high demand for other type of new sanitizers (Gil et al., 2009). This

opened a large field of research aiming to develop new methodologies able to reduce decay and pathogenic microorganisms in shredded RTE vegetables. A trend on natural products to be used as an effective alternative to chlorinated solutions has increased, as demonstrated by several published works (Santos et al., 2012), for example Akbas and Ölmez (2007) for ascorbic acid, Beuchat et al., (2004) for acetic acid; Tian et al. (2011) for essential oils, among others. Several antimicrobial washing solutions, O<sub>3</sub>, UV–C radiation, intense light pulses, super high O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O and noble gases, alone or in combination, are other presently considered promising treatments (Artés et al., 2009) But most of these alternatives are high in costs and/or induce odour and alterations to the organoleptic properties of the foods to which they are applied.

In the last decade, lactic acid and lactic acid bacteria-fermented products have also been suggested to be a good disinfecting alternative for chlorine (Santos et al, 2015). Lactic bacteria are well known for their ability to dominate in different media, producing lactic acid and bactericide polypeptides (Rizello et al., 2005) and lactic fermentation has been known, since ancient ages, as a path to stabilisation of various foods (e.g. sauerkraut; yogurt; pickling), as marinade and food preservative. Since these natural bactericide products are generally accepted as safe (GRAS with grade 1 status), the restrictions to their safe use in food products is minimal (Bjorkroth and Koort, 2011). A low-cost and simple manner to develop a health-safe and effective food disinfectant from lactic acid bacteria is through whey, which a by-product of cheese production. This type of strategies presents environmental advantages as well, since whey production poses a worldwide significant pollution problem. In a recent work we developed a whey fermentation process using a specific starter of mesophilic-LAB strains from cheese manufacturing, which contain high antibacterial effects (Santos et al., 2015). The fermentation process was developed to produce the highest amount of lactic acid in a low-cost and efficient manner and was successfully used as anti-microbial agent in lettuce sanitising, reducing some of the most common pathogenic strains in lettuce, such as *Salmonella* Goldcoast; *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 (Santos et al., 2016).

Nonetheless, the presence of lactic acid, lactose and proteins can introduce changes in organoleptic conditions which may not be well received by the consumer. Hence, although several works have shown lactic acid fermented products' efficacy against an array of pathogenic bacteria, very few have shown their effect in MP's organoleptic features. This is fundamental for its validation as a post-harvest disinfection agent. Also, few reports aim at developing lactic acid production in a cost-effective way or to improve whey's disinfection potential.

Martin-Diana et al. (2006) has tried to use whey permeate in sanitising shredded iceberg lettuce and carrot, concluded that the whey permeate showed activity against microorganisms and the quality indexes for those products were not substantially affected. But so far, fermented whey has never been

tried. Furthermore, according to Niemira et al. (2002) subtle differences between lettuce types can significantly influence sensitivity of associated pathogenic bacteria, so other types of MP vegetables, particularly lettuce should also to be tested, particularly those more sensitive to decay, such as shred loose leaf lettuce.

The difference between fermented whey and regular cheese whey is that through fermentation, there is a higher production of lactic acid, and a concomitant reduction in the protein load, whilst maintaining the antibacterial properties of whey, which may enhance shelf life. Altogether, these features may provide useful to reduce its impact on the organoleptic profiles of MP fruits and vegetables. In order to pursue the use of this fermented whey for food quality and safety in F&V, it is of importance to evaluate the implications of its use on the quality and organoleptic features of the product. Under this context, this work was designed to test the effect of fermented whey application on RTE shredded lettuce quality indexes such as texture, color and sensory perception, in parallel with microbial quantification, pH determination and O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in comparison to chlorine disinfection. The final goal will be to determine its efficacy as a chlorine alternative in salad disinfection.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Fermented whey**

The whey used in this work was obtained after manufacture of cheese from a mixture of ewe, goat and cow's milk. The fermentation assays were performed as previously described by Santos et al. (2015). Based on results obtained in that previous experiment it was decided to utilize the 3:1 (v/v) whey dilution in water in the present work.

### **2.2. Experimental design**

Loose leaf lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*) samples were purchased at a local biological market, always to the same organically grower, on the same day of the experiments. Samples were treated in parallel with whey solution and a chlorine solution of 110 mg L<sup>-1</sup> by dissolving Amokina® (Angelini, Portugal) in sterile water, according to the manufacturer instructions. Outer leaves of the lettuces, with damaged signal were discarded; the inner ones were cut, using a cylindrical metal cutter with 6 cm diameter, in order to take representative portions of all parts of the plant tissue. Circles of lettuce leaves were then washed in distilled water for removing some soil debris that may be adherent to the leaves. Subsequently three different solutions were used to sanitize/wash the lettuce shreds: 1) Distilled water acting as the reference; 2) Chlorinated solution (110 mg L<sup>-1</sup> of Amokina®), as previously described; 3) A 3:1 (v/v) fermented whey solution in distilled water (Santos et al., 2015). The three different treatments were carried out in plastic bags filled with about 200 g of lettuce shreds, from the



three different zones of the lettuces (outer, inner and middle leaves) immersed in 1 L of the sanitizing/washing solutions. Bags were sealed and soaked for 5 min at 4 °C using an incubator with orbital shaking (Panasonic MIR 154, Japan). After that, lettuce shreds were rinsed into sterile distilled water to remove sanitizers and finally, the excess of surface water was removed by a handheld salad spinner (IKEA Tokig, Portugal) for about 30 s. Processed lettuce were pooled and packed, 100 g of shredded lettuce per bag, in heat-sealing bags (300 x 230 mm) of 30 µm oriented polypropylene (OPP) (Amcor Flexibles Neocel, Portugal) graciously granted by Campotec SA. A bag prepared with 100 g of lettuce just soaked in distilled water, whose excess was also removed by the salad spinner, was marked as 0 d and served as the reference. To evaluate O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> changes, three independent bags were separated. Samples were stored at 4 °C for subsequent evaluation of microbial growth, O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> changes, pH, texture, color and sensory quality on processing day (0 d) and after 1, 3, 5, 7, 9 and 10 d of storage. The experiments were done in three independent trials.

### **2.3. O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> contents**

Concentrations in CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> within of the headspace of sealed bags of fresh cut lettuce were monitored along the 10 d of storage. In order to monitor levels of these two gases, the samples bags were perforated by the equipment needle introduced through an adhesive piece fixed on the bags and measured using a headspace gas analyzer (CheckMate 9900 PBI Dansensor, Denmark), sealed with adhesive and back to the cold room and monitored trough out the ten days. Triplicate samples were used in three different separated bags for each assay, independent from other analysis.

### **2.4. pH measurement**

The samples were prepared by mixing ten gram of each sample with 20 mL of deionized water in sterile stomacher bags (Seward Limited, London, UK) and then homogenized in a Stomacher (Model 400 Circulator, Seward Limited, London, UK), during 2 min at regular speed. Afterwards the pH of samples was measured with a Metrohm 827 pH Lab with a 6.0228.010 Primatrode with NTC electrode (Metrohm, Herisau, Switzerland).

### **2.5. Texture analysis**

The texture features of lettuce samples were evaluated in a puncture test with a texturometer TA-XTplus (Stable MicroSystems, UK) using a 5 kg load cell. Each sample was fixed between a perforated plate, and an acrylic ring with a 9.7 mm hole, as in a sandwich, and kept in place by a plastic snap to avoid any slipping. A 2 mm diameter inox probe penetrated (5 mm distance) the sample, through the hole in the ring, at 1 mm s<sup>-1</sup> crosshead speed. From the force-distance texturogram two parameters

*Capítulo 6. Impact of a new postharvest disinfection method based on fermented cheese whey on the organoleptic profile of minimally processed lettuce*

were evaluated: firmness, as the maximum rupture force (N) in the yy axis, and brittleness defined as the rupture deformation (mm), corresponding to the distance of the peak on the xx axis.

## **2.6. Color measurement**

Sample color was measured on the CIELAB  $L^*a^*b^*$  chromatic space with a Minolta CR-300 colorimeter (Minolta, Osaka, Japan) with standard illuminant D65 and a visual angle of 2°. Tri-stimulus color coordinates (CIELAB system) were used to measure the degree of lightness ( $L^*$ ) which ranges from 0 (black) to 100 (white), redness (a) ranging from -60 (green) to +60 (red) and yellowness (b) ranging from blue (-60) to yellow (+60). The instrument was initially calibrated using a white ceramic tile ( $L^*97.21$ ;  $a^* 0.13$ ;  $b^* 2.00$ ). The measurement was performed by placing a piece of lettuce directly under the sensor and at least 30 measurements were done by treatment and day of evaluation, covering three different leaves coloration picked by naked eye selection (dark green, median green and light green).

## **2.7. Sensory evaluation**

Evaluation of sensory quality of the samples, after washing with the sanitizing agents, along the ten days of storage, was performed by a panel of ten untrained members. Panelists were required to evaluate changes in visual quality (appearance/freshness), texture, flavor, off-odors, color (browning) and overall acceptability of samples. Samples were scored by an hedonic scale from 1 to 9 with descriptors anchored at both ends (dislike, not characteristic of the product and like very much, very characteristic of the product) to describe attributes considered. The limit of acceptance from the consumer's point of view is set to be 5, and values below this point indicate unacceptable samples.

## **2.8. Microbial analysis**

Enumeration of Aerobic Microorganisms at 30 °C (AM), Psychrotrophic Microorganisms (PM) and Lactic Acid Bacteria (LAB) were performed in duplicate plates as previously described by Santos *et al.* (2015). Counts were performed for lettuce shreds before and after sanitizing treatments, to monitor microbial development during storage at 1, 3, 5, 7, 9 and 10 d in three independent trials.

## **2.9. Statistical analysis**

Statistical analysis was made by applying variance analysis, the one factor (ANOVA), and *post-hoc* multiple comparisons (Tukey test).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Quality markers in lettuce

##### 3.1.1. O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> measurements

Figure 1 A resumes the monitoring of the O<sub>2</sub> contents in the lettuce bags, along the ten days of cold storage. It can be seen that oxygen was practically kept constant around 6 mol kg<sup>-1</sup> for the reference samples, treated with water. For shredded lettuce sanitized with fermented whey, there is a reduction from 6.1 to 5.6 mol kg<sup>-1</sup> at the first day and then it remained practically constant and in the case of washing with chlorine the reduction continues until the third day to values around 5 mol kg<sup>-1</sup>.

For the production of CO<sub>2</sub>, in figure 1 B, less pronounced differences are shown: for the water treated bags the values slightly increased to 0.1 mol kg<sup>-1</sup>. In the case of the whey treatment the increase is steep on the first day, up 0.14 mol kg<sup>-1</sup>, and remains around that value on the subsequent days with an increase on the tenth day to 0.18 mol kg<sup>-1</sup>, not far from the reference line. The bags treated with chlorine showed the highest variation with a steep increase close to 0.22 mol kg<sup>-1</sup> on the third day progressing in a plateau until the seventh and increasing up to 0.30 mol kg<sup>-1</sup> on the ninth and tenth days.

From these features, it is apparent that the bags treated with chlorine showed a higher reduction in O<sub>2</sub> levels and a larger production of CO<sub>2</sub>, compared to the reference and whey treated bags.

Consumption of O<sub>2</sub> and production of CO<sub>2</sub> can come from respiration of the lettuce leaves and AM as well as further production of CO<sub>2</sub> from anaerobic fermenting microorganisms. It seems that water and whey treated samples have a lower biological activity. Since from the microbial results, the water treated samples are the ones with higher levels of contamination, but showing smoother changes in the O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> levels, the higher changes detected in the samples treated with chlorine should be due to the response of the lettuce cell leaves to the chemical stress of the chlorinated compounds.

##### 3.1.2. pH measurement

The pH was followed during cold storage of packed shredded lettuce sanitized with water (reference), 110 mg L<sup>-1</sup> of chlorine solution and 3:1 (v/v) of fermented whey solution in water. From figure 2 we can observe that there are no major differences between the pH of the different treatments with a tendency to a slight increase along the ten days period. The reference, i.e., lettuce washed with distilled water, is the sample where the increase on pH is significantly ( $p < 0.05$  i.e.  $p = 8.8 \times 10^{-6}$ ) higher, from 6.16 to 7.00, but still less than a unit of variation for a storage period of ten days. Martin-Diana et al. (2006) reported a similar increase in pH in a similar study with lettuce and carrots. They concluded that this was a good index for the potential quality keeping of the products.

According to Beuchat (1992) vegetable products keep adequate quality in a pH range of 5-6.5. Our results show that samples treated with whey exceeded this value (6.57) only on day nine and the samples treated with chlorine exceeded it on day seven (6.75).

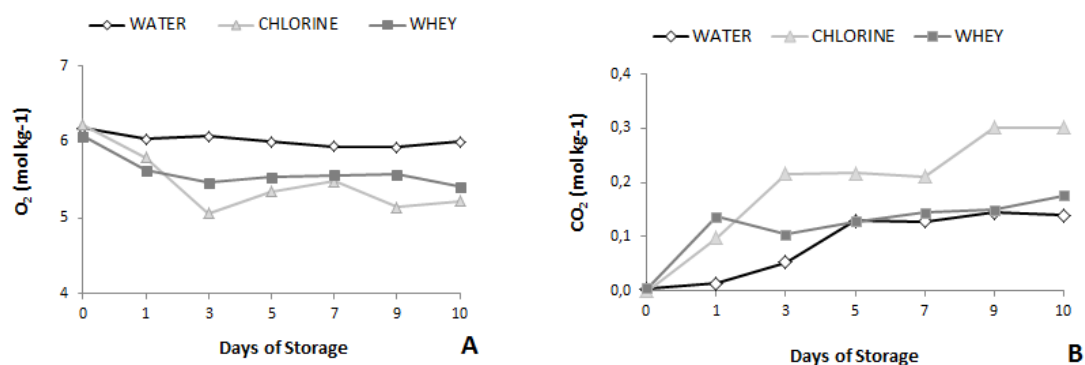


Figure 1. Oxygen measurements (A) and carbon dioxide (B) for packed sanitized shredded lettuce with different sanitizer treatments, during 10 days in cold storage.

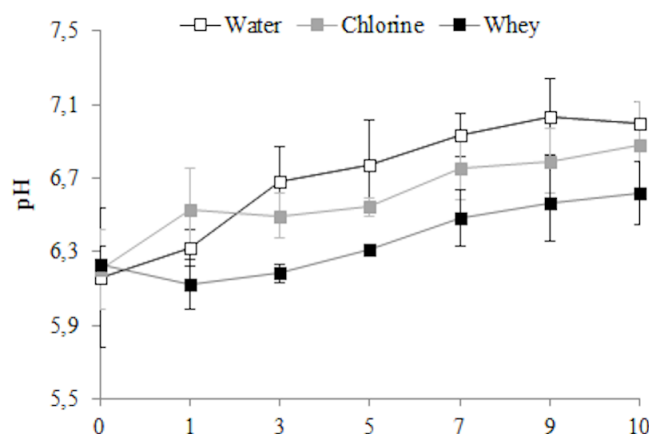


Figure 2 – pH measurements of the lettuce after sanitizer treatments, during 10 days in cold storage

### 3.1.3 Texture

Texture is a major quality parameter, together with color they are crucial for consumer acceptance. Texture measurements evaluated two parameters: resistance to puncture as a force in N and deformation at rupture in length (mm), generally described as firmness and brittleness (the lower the deformation, the brittle the material is) respectively. Results are shown in figure 3 A and B. As seen in figure 3 A, firmness of the lettuce shreds is not substantially affected by treatment and variation within ten days of storage is quite small. In agreement with the pH variation, the reference treatment, with water, is where the highest difference is found: 74 mN significantly ( $p = 2.2 \times 10^{-6}$ ) less firm and 0.177

Capítulo 6. Impact of a new postharvest disinfection method based on fermented cheese whey on the organoleptic profile of minimally processed lettuce

mm less brittle ( $p = 0.0027$ ) after ten days in cold storage, i.e. a reduction of 12 % in firmness and 7 % in brittleness. In the case of the sanitizing with whey the reverse was found, i.e., there was a significant increase in firmness of 69 mN ( $p = 8.2 \times 10^{-6}$ ), corresponding to a 10% increment and no significant variation on brittleness ( $p > 0.05$ ) and this can be due to the calcium ions present in the whey solution that might reinforced the walls of the lettuce cells.

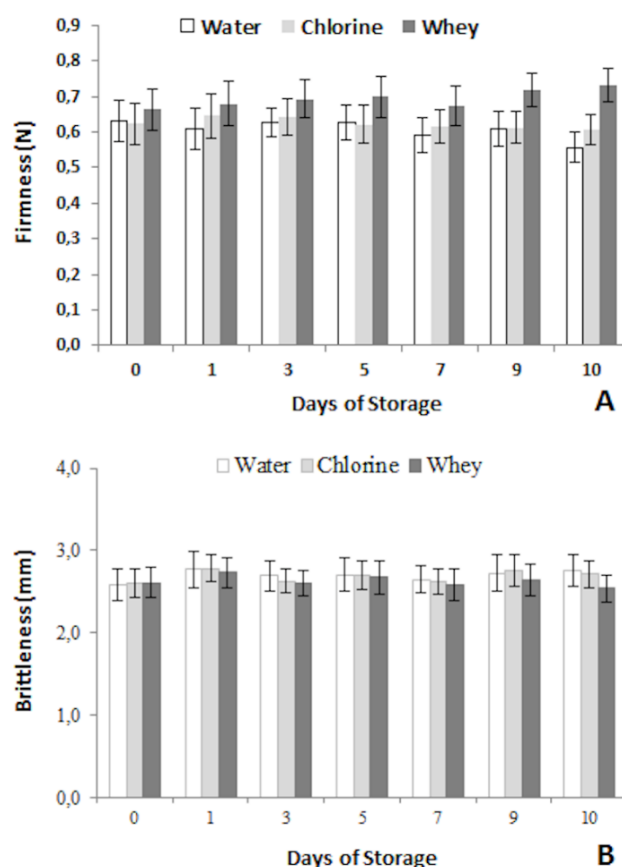


Figure 3. Firmness (A) and Brittleness (B) of the lettuce after sanitizer treatments, during 10 days in cold storage.

### 3.1.4. Color measurement

In table 1 the lightness  $L^*$  color parameter for shreds of mid tone, i.e. median green, can be seen. These results are too scattered to be able to differentiate between sanitizing treatments. The same was observed for the other color coordinates  $a^*$  and  $b^*$ . Although 30 shots were taken for each measurement and standard deviations are not high, the chances of taking shreds from different color groups is high and unable conclusive results from these experiments. Nevertheless, it can be said that color was not dramatically affected by all treatments.

### 3.1.5. Sensory evaluation

From the sensory evaluation one can see the resulting spider diagrams for whey and chlorine treatments on figure 4 A and B respectively. Therefore, from the spider diagrams one can see that all the attributes were highly scored, always above the midpoint 5, along the ten days of cold storage.

To compare the two treatments, overall acceptability was chosen to represent the sensory results and in figure 5 it can be seen that there are two major plateaus. The first with top scores until day five and the second with scores around 6 from the seventh to the tenth day of cold storage. From these results no differences can be seen for the two treatments, with whey or with chlorine.

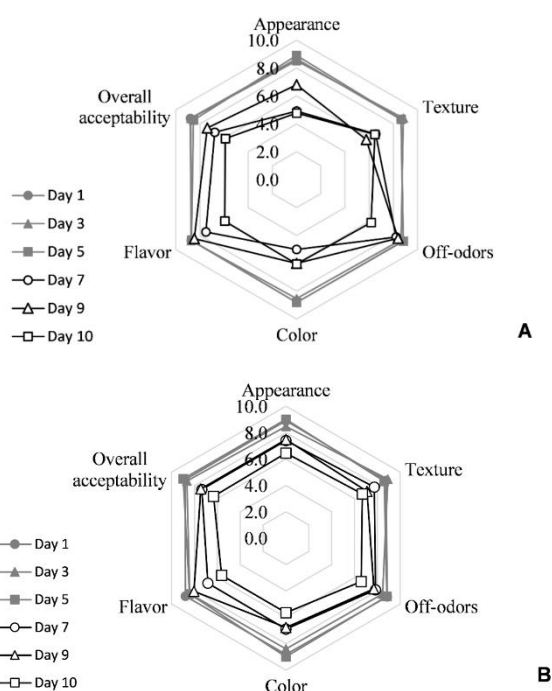


Figure 4. Sensory scores of the lettuce treated with chlorine solution (A) and Fermented whey (B) along 10 days in cold storage



Figure 5 – Overall acceptability of the lettuce treated with fermented whey and chlorine along 10 days in cold storage.

### **3.2. Microbial markers**

#### **3.2.1. Aerobic Microorganisms at 30 °C**

Enumeration of AM (aerobic microorganisms) at 30 °C is an indicator of quality and gives an estimate of total viable populations, both endogenous and contaminant microbiota, since microorganisms are inevitably introduced during manipulations (HPA, 2009). But, in general, the initial contamination of vegetables reflects the microbiota environment in which they were grown (Barth et al., 2009; Tauxe et al., 1997). Before treatments (0 d), the initial AM was 6.10 log CFU g<sup>-1</sup>. Other works have found similar results in whole vegetables (Abadias et al., 2008; Ponce et al., 2002; Santos et al., 2015). As it can be observed in figure 6 A, AM counts sharply decreased after all treatments ( $p < 0.05$ ). Throughout all the storage days, samples treated with whey always presented a significantly lower AM count ( $p < 0.001$ ) when compared to water and to chlorine, and independently of time ( $p < 0.001$ ). This is a strong indication of the effectiveness of fermented whey as an alternative disinfectant. Nonetheless, the AM count significantly differed throughout the storage days, for all treatments. In day one the reduction (2.3 log CFU g<sup>-1</sup>) was very significant ( $p < 0.001$ ), more effective for whey treatment than for lettuce disinfected with chlorine (1.31 log CFU g<sup>-1</sup>). From there on a significant increment ( $p < 0.05$ ) in AM counts occurred for all treatments, up to a point when AM counts surpassed the initial load ( $p < 0.05$ ) and this occurred in day seven for whey treatment and in day five for chlorine. These results are in accordance with those found by Martin-Diana et al., (2006) and Santos et al. (2015). Only at day ten there were no significant differences found between whey and chlorine treatments. The maximum result obtains in this work for AM level, ca. 7 log CFU g<sup>-1</sup>, is within values (6-8 log CFU g<sup>-1</sup>) indicated as safe for this type of products (HPA, 2009). Several studies refer that AM counts at levels of 3 to 6 log CFU g<sup>-1</sup> are common in MP vegetables evaluated immediately after packaging (Belletti et al, 2008; Ragaert, et al., 2007; Siroli et al., 2015). Nevertheless, at retail level, counts can reveal higher levels, ranging between 3 and 9 log CFU g<sup>-1</sup> (Belletti et al., 2008). This can be understood since MP products are more perishable than the produce in natura (Francis et al., 2012; Selma et al., 2008) as cutted surfaces lead to the increase in nutrients availability to microbes, concomitantly the metabolism of tissues increases. In addition, the confinement of the products inside packages and the fact that disinfectants failed to ensure stability also favors the growth of microorganisms (Francis et al., 2012; Lanciotti et al., 2004).

#### **3.2.2 Psychrotrophic Microorganisms**

Similarly, to AM, PM (psychrotrophic microorganisms) counts were significantly reduced ( $p < 0.05$ ) in all treatments at day one (figure 6B). Also, the highest count reduction ( $p < 0.001$ ) to 2.20 log CFU g<sup>-1</sup>, occurred in samples treated with whey. With chlorine, the count reduction found was 1.13 log CFU g<sup>-1</sup>. In the case of the PM, both for the lettuce treated with whey as well as with chlorine,

Capítulo 6. Impact of a new postharvest disinfection method based on fermented cheese whey on the organoleptic profile of minimally processed lettuce after five days in cold storage, there were no significant differences between both treatments in respect to these counts.

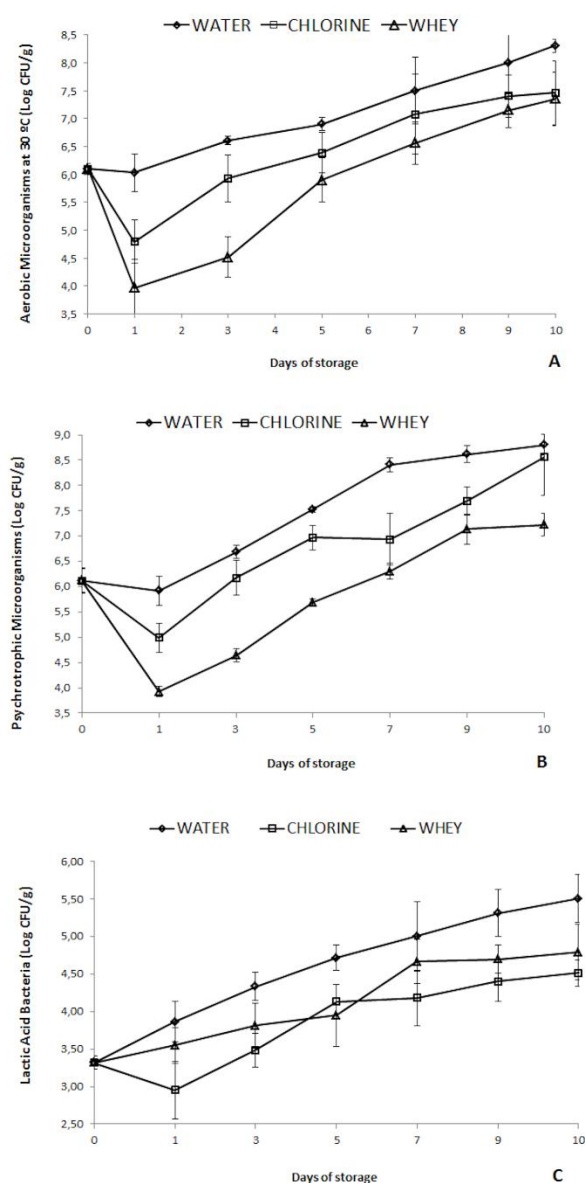


Figure 6. Packed shredded lettuce: Effect of sanitation of shredded lettuce on Aerobic Microorganisms (A), Psychrotrophic Microorganisms (B) and Lactic Acid Bacteria (C) during 10 days in cold storage

### 3.2.3 Lactic Acid Bacteria

Because whey contains naturally high counts of LAB (in this case  $10^7$  CFU  $g^{-1}$ ), which could induce a higher bacterial load into the product, we investigated the evolution of LAB counts in all treatments, throughout cold storage time and results are presented in figure 6 C. As it can be seen, although in day one there was a significant difference between LAB counts in all treatments, from day three onward,



the presence of live LAB from fermented whey did not confer a significant difference ( $p>0.05$ ) when compared to chlorine and water treatments. This type of bacteria is normally present in MP vegetables in loads from 2 to 6 log CFU g<sup>-1</sup>, (figure 6 C, at day zero our reference sample was around 3.5 log CFU g<sup>-1</sup>) so LAB counts ended up being similar in all treatments tested, meaning that the introduction of LAB from whey would not pose any noticeable difference to the final product. Furthermore, it has been shown that the presence of these LAB could have a positive antimicrobial effect in lettuce and apple delicious (Trias et al., 2008). Furthermore, the presence of lactic acid, antibacterial peptides and low pH are contributive factors for the inhibitory effect of whey (Beuchat, 2000; Nykänem et al., 1998; Yang et al., 2012). Furthermore, the presence of lactic acid, antibacterial peptides and low pH are contributive factors for the inhibitory effect of whey (Beuchat, 2000; Nykänem et al., 1998; Yang et al., 2012).

#### **4. Conclusion**

Overall, our established fermentation for industrial whey showed indeed an effective and low-cost disinfecting agent when applied to lettuce, with better or similar results when compared to a 110 mg L<sup>-1</sup> chlorine solution, but also importantly, it did not altered the quality parameters of the shredded loose-leaf lettuce, which is higher prone to decay. Color was not substantially affected and panelists were not able to discriminate from chlorine treatments. Furthermore, lettuce shreds treated with fermented whey showed a slight reinforcement within the cold storage time. Overall, this not only suggests that our fermented whey is indeed as effective as chlorine, but also corroborates that our technology of whey fermentation is effective in reducing the quality changing effects induced by whey.

Taking into account the well-known antibacterial effects of whey, the present work validates that fermented whey can be regarded as a viable, healthier and cost-effective alternative to chlorine for shredded lettuce, with high potential for the food industry and house-hold uses.

#### **Conflict of interest**

The authors declare no potential conflict of interest.

#### **Acknowledgments**

Authors would like to acknowledge Sara Bernardes Silva, Technical Director of Indústria de Laticínios SA, Portugal, for kindly providing the cheese whey used in this work; Rosália Furtado, Maria João Barreira, Anabela Coelho, from the Food Microbiology Laboratory of Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) and Lidia Joaquim from Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT), for technical assistance.

Table 1 - Lightness (L\*) color parameter of the lettuce after sanitizer treatments, during 10 days in cold storage.

Days of Storage	WATER			CHLORINE SOLUTION			FERMENTED WHEY SOLUTION		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
<b>0</b>	72.0 ± 4.4	-20.9 ± 1.4	39.0 ± 1.1	97.6 ± 2.4	-19.8 ± 1.2	37.2 ± 0.9	72.1 ± 1.7	-21.3 ± 0.9	38.3 ± 1.7
<b>1</b>	70.2 ± 3.3	-20.8 ± 2.4	33.1 ± 1.2	72.7 ± 3.2	-20.4 ± 0.9	36.7 ± 1.0	103.3 ± 2.8	-21.3 ± 0.6	40.9 ± 2.5
<b>3</b>	71.6 ± 3.7	-17.3 ± 1.4	33.1 ± 1.9	69.2 ± 3.4	-20.7 ± 0.9	39.3 ± 2.5	107.1 ± 3.1	-20.9 ± 0.9	37.8 ± 2.2
<b>5</b>	101.8 ± 2.3	3.8 ± 1.3	2.4 ± 1.8	100.5 ± 1.5	-19.2 ± 0.8	34.3 ± 1.3	61.5 ± 3.3	-19.5 ± 1.3	36.3 ± 2.3
<b>7</b>	74.5 ± 2.9	-19.1 ± 1.4	36.1 ± 1.9	95.2 ± 1.9	-10.8 ± 1.0	17.8 ± 2.3	64.9 ± 2.2	-20.2 ± 0.8	37.4 ± 2.2
<b>9</b>	94.2 ± 3.8	-19.4 ± 1.7	39.7 ± 2.7	98.5 ± 1.8	-20.1 ± 1.5	35.2 ± 2.7	95.0 ± 2.5	-19.6 ± 1.5	37.9 ± 2.3
<b>10</b>	97.1 ± 4.0	-19.0 ± 1.6	36.5 ± 1.7	105.6 ± 3.3	-16.2 ± 1.6	35.8 ± 1.9	93.8 ± 3.3	-19.8 ± 1.6	39.9 ± 2.6

Figures are average of 30 measurements covering three leaves coloration of three independent trials

**Funding:** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## References

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I., 2008. Microbiological Quality of Fresh, Minimally-Processed Fruit and Vegetables, and Sprouts from Retail Establishments. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 121-129. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013
- Allende, A., Tomas-Barberan, F. A., Gil, M. I. 2006. Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends Food Sci. Tech.* 17, 513–519. Doi: 10.1016/j.tifs.2006.04.005
- Akbas, M.Y., Ölmez, H., 2007. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 619–624. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02127.x
- Artés, F., Gómez, P., Aguayo, E., Escalona, V., Artés-Hernández, F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biol. Tec.* 51, 287–296. Doi:10.1016/j.postharvbio.2008.10.003
- Barth, M., Hankinson, T., Zhuang, H. Breidt, F., 2009. Microbiological spoilage of fruit and vegetables. In: Sperber, W.H., Doyle, M.P. (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, Springer, New York, pp. 135-183.
- Belletti, N., Lanciotti, R., Patrignani, F., Gardini, F., 2008. Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. *J. Food Sci.* 73, 331-338. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00866.x
- Beuchat, L. R., 1992. Surface disinfection of raw produce. *Dairy Food Environ. Sanit.*, 12, 6-9.
- Beuchat, L. F., 2000. Use of sanitizers in raw fruit and vegetable processing. In: Alzamora, S.M., Tapia, M.S., Lopez-Malo, A. (Eds.), *Minimally Processed Fruits and Vegetables*. Aspen Publication, Gaithersburg, pp. 63-78.
- Beuchat, L.R., Adler, B.B., Lang, M.M., 2004. Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *J. Food Prot.* 67, 1238–1242.
- Bjorkroth J., Koort, J., 2011. Lactic acid bacteria: Taxonomy and Biodiversity. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Encyclopedia of Sciences*. Academic Press, London, pp. 45-48.

Caponigro, V., Ventura, M., Chiancone, I., Amato, L., Parente, E., Piro, F., 2010. Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. *Food Microbiol.* 27, 1071-1077. Doi:10.1016/j.fm.2010.07.011

Francis, G.A., Gallone, A., Nychas, G.J., Sofos, J.N., Colelli, G., Amodio, M.L., Spano, G., 2012. Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Crit. Rev. Food Sci.* 52, 595-610. Doi: 10.1080/10408398.2010.503685

Fröder, H., Martins, C. G., Souza, K. L. O., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M., Destro, M. T., 2007. Minimally processed vegetables salads: Microbial quality evaluation. *J. Food Prot.* 70, 1277-1280.

Gil, M.I., Selma, M.V., López-Gálvez, F., Allende, A., 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 37-45. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.021

HPA (Health Protection Agency), 2009. Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods. <https://www.gov.uk/government/publications/ready-to-eat-foods-microbiological-safety-assessment-guidelines>. Accessed 09/06/2016.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., Gardini, F., 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends Food Sci. Tech.* 15, 201-208. Doi:10.1016/j.tifs.2003.10.004

Leistner, L., Gould, G., 2002. *Hurdle Technologies: Combination Treatments for Food Stability, Safety and Quality*, first ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Martin-Diana, A., Rico, D., Frias, J., Mulcahy, J., 2006. Whey permeate as a bio-preservative for shelf life maintenance. *Innov. Food Sci. Emerg.* 7, 112 – 123. Doi:10.1016/j.ifset.2005.08.002

Martinez-Sanchez, A., Allende, A., Bennett, R.N., Ferreres, F., Gil, M.I., 2006. Microbial, Nutritional and Sensory Quality of Rocket Leaves as Affected by Different Sanitizers. *Postharvest Biol. Tec.* 42, 86-97. Doi:10.1016/j.postharvbio.2006.05.010

Niemira, B.A., Sommers, C.H., Fan, X., 2002. Suspending Lettuce Type Influences Recoverability and Radiation Sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* 65, 1388-1393.

Nykänen, A., Lapveteläinen, A., Kallio, H., Salminen, S., 1998. Effects of whey, whey-derived lactic acid and sodium lactate on the surface microbial counts of rainbow trout packed in vacuum pouches. *LWT-Food Sci. Technol.* 31, 361-365. Doi:10.1006/fstl.1998.0372

Ölmez, H., Kretzschmar, U., 2009. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-Food Sci. Technol.* 42, 686–693. Doi:10.1016/j.lwt.2008.08.001

Ponce, A. G., Roura, S. I., Del Valle, C. E., Fritz, R., 2002. Characterization of native microbial population of Swiss Chaed (*Beta vulgaris*, type cicla). *Lebensm. Wiss. Technol.* 37, 199 – 204. Doi:10.1006/fstl.2001.0879

Ragaert, P., Devlieghere, F., Debevere, J., 2007. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biol. Tec.* 44, 185–194. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.01.001

Ramos, B., Miller, F.A., Brandão, T.R.S., Teixeira, P., Silva C.L.M., 2013. Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innov. Food Sci. Emerg.* 20, 1–15. Doi: org/10.1016/j.ifset.2013.07.002

Rizello, C. G., Losito, I., Gobetti, M., Carbonara, T., Bari M.D., Zambonin, P.G., 2005. Antibacterial Activities of Peptides from the Wares-Soluble Extracts of Italian Cheese Varieties. *J. Dairy Sci.* 88, 2348-2360. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72913-1

Sapers, G.M., 2003. Washing and Sanitizing Raw Materials for Minimally Processed Fruits and Vegetables. In: Novak, J.S., Sapers, G.M., Juneja, V.K. (Eds.), *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*. CRC Press, Boca Raton, pp. 221-253.

Santos, M. I., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M. R., Nogueira, P. J., Pedroso, L., Ferreira, M.A.S.S., 2012. Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control*, 23, 275-281. Doi: org/10.1016/j.foodcont.2011.06.022

Santos, M.I.S., Martins, S.R., Pedroso, L., Sousa, I., Ferreira, M.A.S.S., 2015. Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce. *Food Control*, 50, 477–481. Doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.032

Santos, M.I.S., Lima, A.I., Monteiro, S.A.V.S., Ferreira, R.M.S.B., Pedroso, L., Sousa, I., Ferreira, M.A.S.S., 2016. Preliminary study on the effect of fermented cheese whey on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Goldcoast populations inoculated onto fresh organic lettuce. *Foodborne Pathog. Dis.*, 13, 423-427. Doi: 10.1089/fpd.2015.2079

Selma, M. V., Allende, A., Lopez-Galvez, F., Conesa, M. A., Gil, M. I., 2008. Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for the fresh-cut vegetable industry. *Food Microbiol.*, 25, 809-814. Doi: 10.1016/j.fm.2008.04.005

- Siroli, L., Patrignani, F., Diana I. Serrazanetti, D.I., Gardini, F., Lanciotti, R., 2015. Innovative strategies based on the use of bio-control agents to improve the safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Tech.*, 46, 302-310. Doi: 10.1016/j.tifs.2015.04.014
- Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., Wachsmuth K., 1997. Microbiological Hazards and Emerging Issues Associated with Produce: a Preliminary Report to the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *J. Food Prot.*, 60, 1400-08.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., Huang, B., He, J., Wang, Y., 2011. In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control*, 22, 1992-1999. Doi:10.1016/j.foodcont.2011.05.018
- Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., Montesinos, E., 2008. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 123, 50-60. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.065
- Warriner, K., Namvar, A., 2013. Recent advances in fresh produce post-harvest decontamination technologies to enhance microbiological safety. *Stewart Postharvest Review*, 1, 1-8. Doi: org/10.2212/spr.2013.1.3
- WHO (World Health Organization), 2004. Fruit and Vegetables for Health. Report of a joint FAO/WHO workshop, Kobe, Japan. [http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/fruit\\_vegetables\\_report.pdf](http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/fruit_vegetables_report.pdf). Accessed: 27/05/2016.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, Doi: 10.1186/2191-0855-2-48.

## **CAPÍTULO 8: CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## Considerações Finais

Os consumidores atuais caracterizam-se por uma consciência renovada e interesse crescente em consumir produtos naturais, sem adição de sal, açúcar ou conservantes químicos. Grande parte da população revela preocupação com a dieta e os benefícios para a saúde que esta lhe pode conferir, ocorrendo grande foco nos produtos hortofrutícolas como fontes ricas em nutrientes importantes. No entanto, a nível da indústria de HMP, os desinfetantes mais utilizados continuam a ser produtos à base de cloro, os quais podem deixar resíduos tóxicos nos vegetais. Para responder às exigências dos consumidores é essencial investigar alternativas naturais que possam vir a substituir os produtos químicos como desinfetantes ou conservantes alimentares.

O objetivo deste trabalho foi identificar novos agentes antimicrobianos, biológicos e com benefícios para a saúde humana, que possam ser utilizados na desinfecção de saladas e na indústria alimentar. Para este efeito, foram utilizados, como material biológico, óleos essenciais (OE) e soro de queijo fermentado.

Dos nossos ensaios resultaram concentrações mínimas inibitórias (CMI) e concentrações mínimas bactericidas (CMB), determinadas para os diferentes OE estudados, com valores muito elevados para o objetivo de aplicação pretendido. Contudo, os resultados obtidos com o soro de queijo mostraram um maior potencial como desinfetante.

O soro de queijo, durante décadas considerado um sub-produto da indústria, é presentemente apontado como um produto de valor acrescentado, rico em nutrientes, podendo ser utilizado em aplicações diversificadas. Vários estudos publicados apontam que o ácido láctico e os péptidos resultantes da fermentação do soro de queijo apresentam atividade antibacteriana. Com a realização deste trabalho foi possível verificar que o tempo de fermentação do soro é um fator importante na formação do ácido láctico, bem como na produção dos péptidos bioativos. Foi ao fim de 6 dias de fermentação (144 h) que se obteve o maior teor de ácido láctico, bem como maior quantidade dos péptidos antibacterianos, particularmente um péptido específico, com origem na proteólise de uma caseína, que será patenteado devido ao seu elevado potencial como agente antibacteriano. Quando utilizado na desinfecção de alface, e em comparação com uma solução de hipoclorito de sódio, as várias diluições do soro utilizadas demonstraram uma melhor ou equivalente capacidade de desinfecção, tanto em microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, *Enterobacteriaceae*, como em microrganismos patogénicos inoculados em alface. De notar que foram usados como modelo as bactérias que mais frequentemente têm sido associadas a surtos de toxinfecção alimentar com origem no consumo de vegetais folhosos, ou seja, *S. Goldcoast*, *E. coli* O157 e *L. monocytogenes*.



Utilizando uma estirpe de *L. monocytogenes* como modelo foi possível confirmar que a inibição é dependente da concentração de soro e, por consequência, da quantidade de ácido láctico e péptidos bioativos nele presentes. A CMI determinada para a estirpe de *L. monocytogenes* permitiu verificar que esta foi maior com ácido láctico do que com o soro, permitindo inferir que a capacidade inibitória do soro é devida não apenas ao ácido láctico mas ao conjunto deste com os péptidos bioativos. Com efeito, a produção destes péptidos bioativos foi demonstrada e começou a ser notória após 96 h de fermentação, sendo máxima nas 144 h. O aparecimento de péptidos específicos obtidos da proteólise das proteínas principais do soro do leite, veio reiterar a importância do tempo de fermentação na produção de agentes bioativos, assim como o consórcio de bactérias escolhido e a mistura de soros utilizada. A elevada atividade antibacteriana dos peptídeos isolados, aliada ao facto de serem compostos naturais previsivelmente sem efeitos secundários, abrem portas para a sua utilização tanto como desinfetantes alimentares como na produção de agentes antibióticos ou nutracêuticos. Finalmente, os resultados da avaliação sensorial e de parâmetros de qualidade alimentar, como são a cor e a textura, de alface cortada embalada e conservada no frio até 10 dias, corroboram a sua aplicabilidade no mercado e indústria alimentares.

Assim, em suma, os resultados obtidos neste trabalho apontam para o soro fermentado como uma boa alternativa ao uso de desinfetantes químicos e como um produto com um elevado potencial para a indústria alimentar, para a saúde e para a nutracêutica.

**ANEXO:**  
**PRÉMIO, PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES**

## 1. Prémio

### Projecto DeTOxVega:

Em 29 de março de 2011, este trabalho obteve o 1º lugar no concurso FOOD I&DT para a Tecnologia Alimentar mais inovadora na Feira Ibérica Alimentária e Horexpo Lisboa entre 25 projectos Ibéricos candidatos.

## 2. Artigos

Santos, M.I.S., Martins, S.R., Pedroso, L., Sousa, I. & Ferreira, M. A. S. S. (2015). Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce. *Food Control*, 50, 477-481. doi:10.1016/j.foodcont.2014.09.032.

Santos, M.I., Lima, A.I., Monteiro, S.A., Ferreira, R.M., Pedroso, L., Sousa, I. & Ferreira, M.A. (2016). Preliminary Study on the Effect of Fermented Cheese Whey on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Goldcoast Populations Inoculated onto Fresh Organic Lettuce. *Foodborne Pathogens and Diseases*, Volume 13, Number 8. doi: 10.1089/fpd.2015.2079 (Online Ahead of Print).

## 3. Comunicações

Nunes, MJC, Veríssimo, CSC, Valente, F., Santos, MI, Pedroso, L., Sousa, I. Ferreira, M.A.S.S. (2012). Determination of Minimal Inhibitory and Microbicidal Concentrations of Essential Oils Produced by Mediterranean Plants, 43rd International Symposium on Essential Oils, ISEO, book of proceedings, A.Figueiredo, J.G.Barroso & L.G.Pedro Eds., ISBN: 978-989-20-3188-0, page 76, 5 to 8 September, Lisbon, Portugal.

Santos, M. I. S., Lima, A. I. G., Pintado, C.M.B.S., Monteiro, S. A V. S., Ferreira, R. M. S. B., Pedroso, L., Sousa, I. and Ferreira, M. A. S. S. (2013). Antimicrobial peptides produced by whey fermentation, International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL XVIII), Book of Abstracts, pág, 227, 19-22 de setembro, Goa, India.

Santos, M.I.S., Pintado, C.M.B.S., Martins, S.R.C., Cação, A.C.S., Pedroso, L., Sousa, I. and Ferreira, M.A.S.S. (2012). Evaluation of potential use of cheese whey fermented extracts in food safety. *II International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2012*, Book of Abstracts, pág 21, 21-23 novembro, Lisboa, Portugal.

Santos, M.I.S., Martins, S.R., Abreu, M., Oliveira, S., Almeida, C., Lima, A.I.G., Monteiro, S.A.V., Ferreira, R.M.S.B., Pedroso, L., Sousa, I. & Ferreira, M.A.S.S. (2014). The biological potential of fermented whey: improving the isolation of antibacterial polypeptides. Abstracts (639262), P048, *7th International Whey Conference 2014*, 7-9 de setembro, Rotterdam, The Netherlands.